

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2001-513999  
(P2001-513999A)

(43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/711		39/395	N
39/395		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00		7/04	
7/04		7/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 137 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-507802(P2000-507802)	(71) 出願人	ジェネンテク・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア 94080 -4990、サウス・サンフランシスコ、ディ ーエヌエイ・ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成10年8月21日 (1998.8.21)	(72) 発明者	アダムス、カメラリア・ダブリュ アメリカ合衆国、カリフォルニア 94043、 マウンテン・ビュー、フリン・アベニュー 116シー
(85) 翻訳文提出日	平成12年2月25日 (2000.2.25)	(72) 発明者	カーター、ポール・ジェー アメリカ合衆国、カリフォルニア 94127、 サンフランシスコ、モンテレー・プールパ ード 1048
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 8 / 1 7 3 6 4	(74) 代理人	弁理士 津国 肇 (外1名)
(87) 国際公開番号	W O 9 9 / 1 0 4 9 4		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成11年3月4日 (1999.3.4)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 9 1 8 , 1 4 8		
(32) 優先日	平成9年8月25日 (1997.8.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 トロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体、及びそれらの治療学的使用

## (57) 【要約】

c - m p l アゴニスト抗体の種々の型が、血液細胞の、特に巨核球及び巨核球前駆細胞の複製、分化又は成熟に影響することが示された。したがって、これらの化合物は血小板減少症の治療に用いられ得る。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** トロンボポエチン受容体に結合するアゴニスト抗体、そのフラグメント、又はその変異体。

**【請求項2】** トロンボポエチン受容体が哺乳類c-mplを含む、請求項1記載の抗体。

**【請求項3】** その抗体が巨核球の増殖、分化又は成長を刺激する、請求項2記載の抗体。

**【請求項4】** その抗体が血小板を産生するために巨核球を刺激する、請求項2記載の抗体。

**【請求項5】** トロンボポエチン受容体がヒトc-mplである、請求項2記載の抗体。

**【請求項6】** ScFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>及びIgGからなる群から選択される、請求項2記載の抗体。

**【請求項7】** ヒト抗体である、請求項2記載の抗体。

**【請求項8】** 非自然発生 (non-naturally occurring) 抗体である、請求項2記載の抗体。

**【請求項9】** 12E10、12B5、10F6及び12D5からなる群から選択される、請求項1記載の抗体。

**【請求項10】** Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5及びAb6からなる群から選択される抗体であって、各々のAb1～Ab6はVH及びVL鎖を含み、VH及びVL鎖は各々枠組のアミノ酸配列によって切り離されたCDR1、CDR2及びCDR3と呼ばれるCDRアミノ酸配列を含み、Ab1～Ab6の各々のVH及びVL鎖の中の各々のCDRのアミノ酸配列が下記表によって選択される、請求項1記載の抗体。

**【表1】**

Ab1:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 5)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 6)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 11)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 12)
Ab2:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 17)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 18)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab3:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 29)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 30)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab4:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 33)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 34)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab5:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 40)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 41)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab6:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 46)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 47)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
	DNA (SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 52)
	タンパク質 (SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 53)

【請求項 1 1】 血小板を産生するために巨核球を刺激しない、請求項 2 記載の抗体。

【請求項 1 2】 検出可能なラベルを有する、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 1 3】 モノクローナル抗体である、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 1 4】 1 本鎖抗体である、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 1 5】 哺乳類 c-m p l 結合フラグメントである、請求項 2 記載の抗体。

【請求項 1 6】 抗体が、請求項 1 記載の抗体であって、不溶性基質に固定化された抗体。

【請求項 1 7】 請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントと、薬学的に許容し得る担体を含む組成物。

- 【請求項18】 無菌である、請求項17記載の組成物。
- 【請求項19】 凍結乾燥した、請求項17記載の組成物。
- 【請求項20】 請求項14記載の複数の抗体を含む、種々の1本鎖抗体のライブラリ。
- 【請求項21】 1本鎖抗体がファージ上に提示された、請求項20記載のライブラリ。
- 【請求項22】 ファージがM13であり、抗体がコートタンパク質3の融合体として提示された、請求項21記載のライブラリ。
- 【請求項23】 20%よりも少ないファージが、1つ以上の融合体をその表面上に提示する、請求項22記載のライブラリ。
- 【請求項24】 その表面上に請求項14記載の抗体を提示しているファージ。
- 【請求項25】 ファージがM13であり、抗体がコートタンパク質3の融合体として提示されている、請求項24記載のファージ。
- 【請求項26】 その表面に唯一の融合体を提示する、請求項25記載のファージ。
- 【請求項27】 そのアミノ末端で請求項1記載の抗体と融合しているファージコートタンパク質の少なくとも一部分を含む融合タンパク質。
- 【請求項28】 ファージコートタンパク質がM13コートタンパク質3である、請求項27記載の融合タンパク質。
- 【請求項29】 巨核球を、効果的な量の請求項1記載の抗体と接触させることを含む、巨核球の増殖、分化又は成長を刺激する方法。
- 【請求項30】 請求項1記載の抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、請求項29記載の方法。
- 【請求項31】 巨核球を、効果的な量の請求項1記載の抗体と接触させることを含む、血小板産生を増加させる方法。
- 【請求項32】 請求項1記載の抗体を、それを必要とする患者に投与することを含む、請求項31記載の方法。
- 【請求項33】 請求項1記載の抗体をコードする、単離された核酸。

【請求項 3 4】 請求項 3 3 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 3 5】 請求項 3 4 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 6】 請求項 3 5 記載の細胞を、該核酸が発現される条件下で培養することを含む、アゴニスト抗体産生方法。

【請求項 3 7】 MuSK 受容体に結合する、アゴニスト抗体、そのフラグメント又はその変異体。

【請求項 3 8】 受容体を、その受容体に結合する 1 本鎖抗体と接触させることを含む、2 つのサブユニットを有する受容体タンパク質を活性化する方法。

【請求項 3 9】 その受容体がチロシンキナーゼ受容体である、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】 その受容体がサイトカイン受容体である、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 1】 請求項 3 7 記載の抗体の効果的な量を患者に投与することを含む、それを必要とする患者の神経筋機能を改善し、及び MuSK 受容体を発現する方法。

【請求項 4 2】 1 本鎖抗体がヒト IgG として発現されている、請求項 3 8 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 【0001】

#### 技術分野

本発明は、造血細胞、特に血小板前駆細胞の生存、増殖、分化又は成熟に影響を及ぼすタンパク質抗体の組換え合成及び精製、並びにタンパク質キナーゼ受容体を発現する細胞の成長及び分化に影響を及ぼす抗体に関する。本発明は、サイトカイン受容体スーパーファミリーの一員であるc-mplのような、トロンプオエチン受容体に結合し、それを活性化することができる抗体リガンド（トロンプオエチン受容体作用抗体）をコードする核酸のクローニング及び発現にも関する。本発明は、更に、血小板減少症を包含する免疫もしくは造血疾患を治療するための、これらの抗体の単独でか、又は他のサイトカインとの併用での使用、及びアッセイにおける使用にも関する。

### 【0002】

#### 発明の背景

1994年に、いくつかのグループが、トロンプオエチンの単離及びクローニングを報告した [F. de Sauvage et al., *Nature* 369: 533 (1994); S. Lok et al., *Nature* 369:565 (1994); TD. Bartley et al., *Cell* 77:1117 (1994); Y. Sohma et al., *FEBS Letters* 353: 57 (1994); DJ. Kuter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11104 (1994)]。これは、Yamamoto [S. Yamamoto, *Acta Haematol. Jpn.* 20: 163-178 (1957)] 及びKelemen [E. Kelemen et al., *Acta Haematol. (Basel)*, 20: 350-355 (1958)] が、生理学的な血小板産生は、「トロンプオエチン」(TPO)と名付けられた体液性因子によって制御されることを提唱した、50年代後期に開始された30年以上の研究の頂点であった。血小板減少症の動物や患者からの尿、血漿及び血清はもとより、腎細胞の馴化培地で常套的に検出されるものの、TPOの精製は、意気阻喪させる仕事であることが判明した [総覧には、MS. Gordon et al., *Blood* 80: 302 (1992); W. Vainchenker et al., *Critical Rev. Oncology/Hematology* 20: 165 (1995)を参照されたい]。精製されたTPOと、無数の多面発現性サイトカインが巨核球形成に影響するという明らかな事実 [MS. Gordon et al., 80: 302 (1992); W. Vainchenker et

al., Critical Rev. Oncology/Hematology 20: 165 (1995)] との不在下で、血小板産生を調節する系列特異的因子の存在は、1990年のオーファンサイトカイン受容体 c-Mp l の発見までは疑問視されていた [M. Souyri et al., Cell 63: 1137 (1990); I. Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 5640 (1992)]。c-Mp l の発現は、前駆細胞、巨核球及び血小板に限定され、c-Mp l アンチセンスオリゴヌクレオチドは、in vitroでの巨核球形成を選択的に阻害することが見出された [M. Methia et al., Blood 82: 1395 (1993)]。これから、c-Mp l は、巨核球形成を調節する際に決定的な役割を果たし、その推定されるリガンドは、長く探索された TPO でありうると考えられた [M. Methia et al., 前掲]。この発見に続いて、c-Mp l リガンド特異的細胞の増殖アッセイと、精製手段としての c-Mp l とを利用したいくつかのグループが、c-Mp l に対するリガンドを単離かつクローン化した [F. de Sauvage et al., 前掲; S. Lok et al., 前掲; TD. Barley et al., 前掲]。加えて、他の二グループが、独立に、標準的クロマトグラフィー手法及び巨核球アッセイを用いた Mp l リガンドの精製を報告した [Y. Sohma et al., 前掲; DJ. Kuter et al., 前掲]。その報告された発見以来何年間に、無数の研究が、Mp l リガンドは、巨核球形成及び血小板形成の調節因子であるとされるものに長く帰せられていた特徴のすべてを保有することを明確に示し、その結果、Mp l は、今や TPO と呼ばれている。現在、Mp l リガンドは、TPO とも、又は巨核球成長及び分化因子 (MGDF) とも呼ばれている。

#### 【0003】

ヒト TPO は、332 個のアミノ酸からなり、二つのドメイン；即ちエリスロポエチン (EPO) と 23% の同一性 (50% の類似性) を示す 153 アミノ酸のアミノ末端ドメインと、高度にグリコシル化された独自の 181 アミノ酸の C 末端ドメインとに分割することができる [F. de Sauvage et al., 前掲; S. Lok et al., 前掲; TD. Barley et al., 前掲]。TPO の EPO 様ドメインは、4 個のシステインを含み、うち 3 個が EPO で保存されている。最初及び最後のシステインと中間の 2 個のシステインとは、それぞれ二つのジスルフィド橋を形成し、活性には両者が必要とされる [T. Kato et al., Blood 86 (suppl. 1): 365

(1995)〕。EPOに存在するAsn結合グリコシル化部位は、TPOのEPO様ドメインには全く保存されていないが、組換えTPO (rTPO) のEPO様ドメインは、2～3個のO結合グリコシル化を有する〔M. Eng et al., Protein Science 5 (suppl. 1): 105 (1996)〕。TPOの組換え断端形態 (rTPO153) は、EPO様ドメインのみからなるにすぎないが、in vitroで完全に機能的であって、このドメインが、Mplを結合かつ活性化するのに必要なすべての構造的要素を含むことを示す〔F. de Sauvage et al., 前掲; DL. Eaton et al., Blood 84 (suppl. 1): 241 (1994)〕。TPOのカルボキシル末端ドメインは、6個のN結合グリコシル化部位、及び18個のO結合糖鎖部位を含み、プロリン、セリン及びトレオニンに富む〔M. Eng et al., 前掲〕。このドメインの機能は、解明されていない。しかし、その高度のグリコシル化のために、この領域は、循環TPOを安定化し、半減期を延長するよう作用しうる。これは、rTPO153が、完全な長さのグリコシル化されたrTPOの18～24時間に比して、1.5時間という半減期を有するとの所見によって裏付けられる〔GR. Thomas et al., Stem Cells 14 (suppl. 1) (1996)〕。

#### 【0004】

TPOの二つのドメインは、調べられた様々な種間で保存されている、潜在的な二塩基性のタンパク質分解性切断部位によって分けられている。この部位でのプロセッシングは、EPOドメインからのC末端領域をin vivoで遊離させる原因となる可能性があると思われる。この潜在的切断部位の生理学的な関連性は、現時点では明らかでない。TPOが、無傷の完全長の分子としてか、又は断端形態として循環するのも、あいまいである。無形成性のブタの血漿をゲル濾過クロマトグラフィーに付したとき、この血漿中に存在するTPO活性は、～150,000の分子量で分離した〔F. de Sauvage et al., 前掲〕。精製された完全長rTPOも、この分子量で分離するのに対し、断端形態は、18,000～30,000の範囲の分子量で分離する。完全長又は断端TPOのいずれかを選択的に検出するTPOのELISAを用いて、骨髓移植患者の血漿中では、完全長TPOが優勢であることも示されている〔YG. Meng et al., Blood 86(suppl. 1): 313 (1995)〕。



# 【0005】

c-Mpl の発見、及び TPO の単離以前は、巨核球形成は、多種の細胞レベルで調節されたと考えられた [MS. Gordon et al., 前掲; W. Vainchenker et al., 前掲; YG. Meng et al., 前掲]。この仮説は、一定の造血性成長因子は、巨核球前駆細胞の増殖を刺激するが、その他は、専ら成熟を左右するとの所見に基づいた [MS. Gordon et al., 前掲; W. Vainchenker et al., 前掲; YG. Meng et al., 前掲]。他のデータは、血小板減少症の動物からの血漿が、巨核球の増殖 (meg-CFS) 又は成熟 (TPO) のいずれかに影響する明確な活性を有することを示した [RJ. Hill et al., Exp. Hematol. 20: 354 (1992)]。Wendling とその同僚 [F. Wendling et al., Nature 359: 571 (1994)] は、血小板減少症の血漿中のすべての巨核球コロニー刺激性及び血小板形成性活性は、可溶性 Mpl によって中和できる可能性があることを立証することによって、この仮説を初めて駆逐した。これは、これらの活性が、唯一の因子、即ち Mpl リガンドによることを示した。今では、無数の研究が、TPO の組換え形態が、前駆巨核球の増殖だけでなく、成熟も誘導することを示している [K. Kaushansky et al., Nature 369: 568 (1994); FC. Zeigler et al., Blood 84: 4045 (1994); VC. Broudy et al., Blood 85: 1719 (1995); JL. Nichol et al., J. Clin. Invest. 95: 2973 (1995); N. Banu et al., Blood 86: 1331 (1995); N. Debili et al., Blood 86: 2516 (1995); P. Angchaisuksiri et al., Br. J. Haematol. 93: 13 (1996); ES. Choi et al., Blood 85: 402 (1995)]。rTPO とともに培養されたヒト CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> 細胞 [FC. Zeigler et al., 前掲; VC. Broudy et al., 前掲; JL. Nichol et al., 前掲; N. Banu et al., 前掲]、又は精製されたマウス幹細胞 (sca<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>, kit<sup>+</sup>) [K. Kaushansky et al., 前掲; FC. Zeigler et al., 前掲] は、巨核球へと選択的に分化する。rTPO は、半固体培養での巨核球コロニーと、液体懸濁培養での単一巨核球の分化及び増殖を誘導する。この活性は、限界希釈実験が、播種した前駆細胞と、得られた巨核球との間の直接の相関関係を示す (N. Debili et al., 前掲) ことから、TPO の直接効果であると思われる。加えて、無血清又は含血清の培養条件でも、匹敵する結果が得られる [N. Banu et al., 前掲; N. Debili et al., 前掲; P. Angchaisu

ksiri et al.、前掲〕。これらの所見は、TPOが、巨核球の成長及び分化をin vivoで誘導するのに、補助細胞又は血清成分のいずれも必要とされないことを示す。

#### 【0006】

巨核球の成熟過程に対するrTPOの効果は、劇的である。rTPOは、液体培養での高度に精製されたマウスもしくはヒト前駆細胞を、非常に大きい成熟倍数体巨核球へと分化するよう誘導する〔FC. Zeigler et al.、前掲；VC. Broudy et al.、前掲；JL. Nichol et al.、前掲；N. Debili et al.、前掲〕。そのような培養体からの巨核球は、4N～16Nの倍数性を示し、64N及び128Nの倍数群も、これらの培養体中に検出される〔N. Debili et al.、前掲〕。加えて、これらの培養から産生された巨核球は、末端成熟過程を経て、前血小板へと発達し、血小板様構造を培地中に放散するよう見える〔FC. Zeigler et al.、前掲；N. Debili et al.、前掲；ES. Choi et al.、前掲〕。重要なことに、そのような培養から産生された血小板は、血漿由来血小板とは形態学的にも機能的にも別個であることが示されている〔ES. Choi et al.、前掲〕。

#### 【0007】

rTPOは、造血前駆細胞に直接作用して、巨核球分化を誘導するよう見えるが、初期及び後期に作用する造血因子と相乗的かつ付加的にも作用する。マウス巨核球形成アッセイでは、IL-11、kitリガンド(KL)又はEPOが、rTPOと相乗的に作用し、IL-3及びIL-6が、付加的に作用して、巨核球前駆細胞の増殖を刺激する〔VC. Broudy et al.、前掲〕。ヒト巨核球形成アッセイでは、IL-3及びIL-6は、rTPOに付加的に影響するが、KLは、rTPOと相乗的に作用する〔JL. Nichol et al.、前掲；N. Banu et al.、前掲；N. Debili et al.、前掲；P. Angchaisuksiri et al.、前掲〕。上記のサイトカインのうち、rTPOの巨核球成熟活性に影響するものは皆無である。

#### 【0008】

rTPOでの当初の研究は、TPOが、巨核球系列に支配的に影響することを明確に示した。しかし、他の造血調節因子と同様に、TPOは、他の造血系列にもまた影響する。EPOの存在下では、rTPOは、ヒトCD34+コロニーアッセ

イで赤芽球バースト (BFU-E) の形成を促進することが示されている [M. Kobayashi et al., Blood 86: 2494 (1995); T. Papayannopoulou et al., Blood 87: 1833 (1996)]。rTPOのバースト促進活性は、GM-CSF及びKLに匹敵し、BFU-Eコロニーの数と大きさとの双方を増大させる [M. Kobayashi et al., 前掲]。加えて、rTPOは、CFU-E発達も刺激して、TPOが、初期及び後期赤芽球前駆細胞の双方に作用することを示す [M. Kobayashi et al., 前掲; T. Papayannopoulou et al., 前掲]。しかし、EPOの不在下では、rTPOは、赤血球形成に対して何ら影響がない。しかし、in vitroでの正常な造血性培養での骨髓球コロニーの成長に対するrTPOの効果は、立証されていない。

#### 【0009】

rTPOは、正常な動物に投与したとき、血小板産生に劇的な効果を有する。組換え形態のTPOの薬理学的用量は、マウス、及び非ヒト霊長類での血小板レベルの、10倍もの多量の増加を生起する [EF. Winton et al., Exp. Hematol. 23:879 (1995); AM. Farese et al., Blood 86:54 (1995); KH. Sprugel et al., Blood 86 (suppl. 1): 20 (1995); LA. Harker et al., Blood 87:1833 (1996); K. Kaushansky et al., Exp. Hematol. 24:265 (1996); TR. Ulich et al., Blood 87:5006 (1996); K. Ault et al., Blood 86 (suppl. 1): 367 (1995); NC. Daw et al., Blood 86 (suppl. 1): 5006 (1995)]。rTPOのこの効果は、網状血小板がrTPOの投与後24時間以内に増加することから、新血小板の合成の増大による [K. Ault et al., 前掲]。この効果に先行して、骨髓及び脾臓の双方でのCFU-MKに劇的な増加がある [AM. Farese et al., 前掲; K. Kaushansky et al., 前掲; TR. Ulich et al., 前掲]。rTPO投与動物からの巨核球は、より高い平均倍数性を示し、大きさが対照動物からの巨核球より大きい。これら後二者の所見は、やはり、巨核球系列に対するTPOの増殖及び成熟活性を立証する。巨核球に対するTPOの効果は、血小板産生に対するその効果に先行するため、TPOは、成熟巨核球からの血小板の放出を誘導するよりは、むしろ巨核球前駆細胞に専ら影響することが示唆されている [NC. Daw et al., 前掲]。rTPO投与後の正常な動物で生じる、赤血球 (RBC) 又は白血球

(WBC) 産生に対する有意な効果は皆無である。しかし、r T P O は、正常マウスでは、B F U - E 及び C F U - G M の拡大と、C F U - E の再配分とを生じ [K. Kaushansky et al., 前掲]、アカゲザルでは混合 C F U を拡大した [AM. Farese et al., 前掲]。

#### 【0010】

r T P O は、たとえ血小板産生を劇的に刺激しても、血小板の機能に対してはそこそこの効果を有するにすぎない。in vitro の研究は、r T P O が、血小板凝集自体には効果が皆無であるが、アゴニストで誘導される凝集を促進することを示している [G. Montrucchio et al., Blood 87: 2762 (1996); A. Oda et al., Blood 87: 4664 (1996); CF. Toombs et al., Thromb. Res. 80: 23 (1995); C F. Toombs et al., Blood 86 (suppl. 1): 369 (1995)]。r T P O は、血小板を感作して、程々に、より凝集アゴニストに応答性にするように思われる。これは、r T P O が in vivo でのプロトロンビンの効果を有しうる可能性を提起する。しかし、r T P O を投与した動物における血栓症発症の増加は、血小板レベルが正常の 4 ~ 10 倍であったときでさえ、観察されたことがない。in vivo 血栓症モデルも、r T P O 投与後の血小板レベルの上昇は、血小板依存性血栓症の増加とは無関係であることを示す [LA. Harker et al., 前掲; CF. Toombs et al., 前掲]。これらの結果は、r T P O による血小板産生の刺激は、血栓性閉塞性事象の増加に関連する可能性がないと思われることを示している。

#### 【0011】

血小板産生の制御における c - M p l 及び T P O の関与、並びに他の造血系列に対するその効果は、c - M p l 又は T P O いずれかの遺伝子を欠くマウスの表現型によって更に立証される [WS. Alexander et al., Blood 87: 2162 (1996); FJ. de Sauvage et al., J. Exp. Med. 183:651 (1996); AL. Gurney et al., Science 265: 1445 (1994)]。いずれの場合も、血小板数の 85 ~ 90 % の劇的な低下が、脾臓及び骨髄での巨核球の類似の減少とともに観察される。加えて、ノックアウトマウスの巨核球は、対照マウスのそれより小型であり、かつ低い倍数性を示す。これらのノックアウト動物 (K O) について観察された表現型での類似性は、この系が非冗長であり、おそらく、T P O に対して 1 個だけ受容体が

、またc-Mp1に対して1個だけリガンドが存在するにすぎないことを示す。KOマウスでは、血小板数は減少するが、その血小板は、構造的にも機能的にも正常のように思われ、明白な出血を予防するには充分である。血小板及び巨核球のこの基底レベルの産生に關与する遺伝子と因子とは、依然として特定されないでいる。しかし、TPO又はc-Mp1のいずれかがノックアウトされたマウスへの、巨核球形成活性を有するその他のサイトカイン（IL-6、IL-11及び幹細胞因子）の投与は、血小板産生のそこそこの刺激を招く〔AL. Gurney et al.、前掲〕。これは、これらのサイトカインが、その血小板形成活性を発揮するのにTPO又はc-Mp1を必要とせず、したがって、巨核球及び血小板の基底レベルの維持に關与しうることを示唆する。

#### 【0012】

TPO又はc-Mp1欠損マウスと、正常マウスとからのCFU-巨核球（CFU-Meg）の比較は、巨核球前駆細胞の数が、対照に比して、両者のノックアウト動物で減少することを示し、TPOは、非常に早期の巨核球前駆細胞に作用することを示唆する。加えて、赤芽球と骨髓球との双方の前駆細胞も、TPO及びc-Mp1ノックアウトマウスでは減少する〔WS. Alexander et al.、前掲；K. Carver-Moore et al.、88: 803 (1996)〕。すべての系列からの前駆細胞のこの減少は、TPOが、おそらく、非常に早期の多能性前駆細胞に作用することを示す。造血の早期段階でのTPO及びc-Mp1の關与は、AA4+Sca+マウス幹細胞集団でのc-Mp1発現の検出と相關する〔FC. Zeigler et al.、前掲〕。この最も原始的な幹細胞集団に対するTPOの効果は、依然として調査されないでいるが、予備的データは、TPOが、原始的なマウス造血幹細胞又は前駆細胞の増殖に直接影響しうることを示す〔E. Stinicka et al.、Blood 87: 4998 (1996)；M. Kobayashi et al.、Blood 88: 429 (1996)；H. Ku et al.、Blood 87: 4544 (1996)〕。これは、TPOがin vitro並びにin vivoでの赤血球形成及び骨髓形成に有する効果を、部分的には説明しうる。

#### 【0013】

血漿巨核球形成及び血小板形成の活性と血小板レベルとの間には、逆相關關係が存在することが長い間觀察されている〔TP. McDonald, Am. J. Pediatr. Hema

tol./Oncol. 14:8 (1992)に総説]。TPO特異的ELISA及び細胞増殖アッセイは、TPOレベルが血小板量とともに上昇し、逆に低下することを今では確認している [J.L. Nichol et al., 前掲; EVB. Emmons et al., Blood 87: 4068 (1996); H. Oh et al., Blood 87: 4918 (1996); M. Chang et al., Blood 86(suppl. 1): 368 (1995)]。しかし、赤血球形成とは異なり、TPOは、転写レベルではなくて、血小板量によって調節されるように見える。これは、de Gabriele及びPenningtonによって最初に提唱され [G. de Gabriele et al., Br. J. Haematol. 13:202 (1967); G. de Gabriele et al., Br. J. Haematol. 13: 210 (1967)]、その後、Kuter及びRosenbergによって確認された [DJ. Kuter et al., Blood 84: 1464 (1994)] が、後者は、血小板減少症マウスに血小板を外部から投与することによって、循環TPOレベルの直接的調節を示した。より近年では、血小板減少症マウスにおけるTPO mRNAレベルは、TPOレベルを少なくとも10倍上昇させても上昇しないことが立証された [PJ. Fielder et al., Blood 87: 2154 (1996); R. Stoffel et al., Blood 87: 567 (1996)]。加えて、TPOヘテロ接合性のノックアウトマウスで観察された遺伝子用量効果は、血小板量によるTPO産生の調節に反する (FJ. de Sauvage et al., 前掲)。考え合わせると、これらの結果は、TPO発現は、構成的であり、TPOレベルを調節するのは、血小板による封鎖であるとの仮説を強く裏付ける。血小板は、TPOを高い親和性 ( $K_d: 100 \sim 400 \text{ pM}$ ) で結合し、TPOを吸収しかつ分解する [PJ. Fielder et al., 前掲]。c-Mplノックアウトマウスからの血小板は、TPOを結合せず、これらのマウスによるTPOのクリアランスは、野生型マウスについて観察されたのより5倍遅い [PJ. Fielder et al., 前掲]。これらの結果は、TPOクリアランスが、c-Mplを介しての血小板の結合によって仲介されることを示す。巨核球量は、循環TPOレベルを調節するのに役割を果たす可能性もある。これは、NF-E2転写因子に欠陥があるITP患者とマウスとの双方が、高度に血小板減少症性であり、巨核球増加症を示すが、正常なTPOレベルを有するとの観察によって裏付けられる [EVB. Emmons et al., 前掲; RA. Shivdasani et al., Cell 81: 695 (1995)]。放射性標識化したTPOによるin situ研究は、NF-E2のマウスの骨髓巨核球が、有意量の標識化

TPOを結合することを示している [RA. Shivdasani et al., Blood、投稿 (1996)]。したがって、ITP及びNF- $\kappa$ Bノックアウトマウスの表現型は、巨核球へのTPOの結合も、TPOレベルを調節しうることを示唆する。

#### 【0014】

正常なマウス及びサルでの血小板産生に対するrTPOの劇的な効果、並びにその後の臨床試験は、rTPOが、癌患者に対する骨髄抑制及び脊髄切断療法に付随する血小板減少症を緩和するのに臨床的に役立つことを示す。骨髄抑制及び脊髄切断のマウスとサルとのいくつかの前臨床モデルで、組換え形態のTPOは、血小板回復に有意に影響することが示されている。カルボプラチンと亜致死照射とを併用で投与したマウスでは [JP. Leonard et al., Blood 83: 1499 (1994)]、rTPOの日次投与は、賦形剤投与の動物と比較したとき、血小板最下点の重篤度を軽減するとともに、血小板回復を10～12日早めた [GR. Thomas et al., 前掲; K. Kaushansky et al., 前掲; MM. Hoken et al., Blood 86: 4486 (1995)]。類似の結果が、マウスの亜致死照射モデルで得られた [GR. Thomas et al., 前掲]。マウスの脊髄切断移植モデルでは、rTPOは、最下点の程度を軽減し、血小板回復を2～3週間早めることが示されている [GR. Thomas et al., 前掲; K. Kabaya et al., Blood 86 (suppl. 1): 114 (1995); G. Molinieux et al., Blood 86 (suppl. 1): 227 (1995)]。亜致死的に照射したアカゲザルへのrTPOの投与は、血小板回復を3週間早め、40,000未満の血小板最下点を防いだ [AM. Farese et al., J. Clin. Invest. 97: 2145 (1996); KJ. Neelis et al., Blood 86 (suppl. 1): 256 (1995)]。はるかに印象的には、rTPOは、アカゲザルへのヘプスルファムの投与後の、化学療法後血小板減少症を完全に防いだ [AM. Farese et al., 前掲]。これらの有望な結果とは対照的に、二つのグループが、rTPOは、致死放射した、骨髄移植で救済したマウス又はサルの造血回復に、何ら効果がなかったと報告している [KJ. Neelis et al., 前掲; WE. Fibbe et al., Blood 86: 3308 (1995)]。この食違いの理由は、不明確であるが、致死放射は、in vivoでのTPO活性に不可欠である基質細胞又は構成部分を破壊しうる可能性がある。これを裏付けるように、rTPO投与した供与マウスからの骨髄細胞を移植した、致死放射したマウスは、血

小板及び赤血球の回復の加速を示したが、r T P Oの移植後投与は、この加速された回復に対して、何らそれ以上の効果がなかった〔WE. Fibbe et al.、前掲〕。この結果は、移植された細胞集団は、巨核球前駆細胞には富むものの、T P Oは、致死放射された骨髄でのこれらの前駆細胞に対して何ら効果がなかったことを示唆する。

#### 【0015】

r T P Oは、正常マウスでの赤芽球及び骨髄球系列にはそこそこに影響するにすぎないが、骨髄抑制されたマウス及びサルでのすべての前駆細胞群の回復を劇的に早めて、R B C及びW B C回復の有意な加速を生じる〔K. Kaushansky et al.、前掲；AM. Farese et al.、前掲；K. Kaushansky et al., J. Clin. Invest. 96: 1683 (1995)〕。好中球回復に対するr T P Oの効果は、G - C S Fのそれに付加的であることが示されている〔AM. Farese et al.、前掲〕。これらの結果は、r T P Oの臨床的効用は、当初予期されたより広くなりうることを示す。

#### 【0016】

正常な動物と骨髄抑制された動物との間でのr T P Oの効果の違いは、骨髄抑制療法後に生じるサイトカイン環境の変化による可能性がある。E P O、G - C S Fその他の、骨髄抑制療法後に存在する赤血球形成及び骨髄形成に不可欠なサイトカインのレベルの上昇は、多系列効果を有するようにr T P Oと作用し合う可能性がある〔K. Kaushansky et al.、前掲〕。正常マウスでは、これらのサイトカインのレベルは、不十分であり、赤芽球及び骨髄球系列に対するr T P Oの効果は、より意義が少ない。この仮説は、in vitro赤血球形成を刺激するためのr T P OとE P Oとの上記の相乗的相互作用によって裏付けられる〔ES. Choi et al.、前掲〕。巨核球自体からの造血因子の産生も、r T P Oの多系列効果に役割を果たしうることも提唱されている〔AM. Farese et al.、前掲〕。

#### 【0017】

上記の動物での研究で、r T P Oは、14～28日間投与されたが、これは、他の造血成長因子を投与する際の従来の経験に基づいた。しかし、カルボプラチン及び亜致死放射によるマウスの骨髄抑制療法後の、r T P Oの一回投与は、



最下点を軽減し、血小板及びRBCの回復を早めるのに、複数回投与と同様に効果的であることが最近示されている〔GR. Thomas et al., 前掲〕。この効果は、rTPOの薬効、及び長い半減期による可能性がある〔GR. Thomas et al., 前掲;〕。これは、非グリコシル化rTPO153の一回投与が、このモデルでは効果的でないという事実によって裏付けられる。これらの所見は、骨髄抑制治療後の造血回復に影響するのに必要なrTPO投与の頻度が、現在用いられるその他のサイトカインについてのそれより有意に低くなりうることを示す。

#### 【0018】

ヒトの臨床試験からの初期の結果は、rTPOがヒトにおける血小板産生も刺激することを示す。第1相試験では、癌患者に化学療法の前に0.03～5.0  $\mu\text{g/kg}$ で10日間毎日投与された、PEG化かつ断端形態のrTPO (MGDF) が、循環血小板レベルの最高4倍の上昇を生じた〔R. Basser et al., Blood 86 (suppl. 1): 257 (1995); JEJ. Rasko et al., Blood 86 (suppl. 1): 497 (1995)〕。同様に、rTPOの一回投与を受けた患者は、血小板レベルの4倍の上昇があった〔S. Vaden-Raj et al., Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in cancer patients, 投稿 (1996)〕。双方の研究で、血小板の増加は、4日目までに観察され、その後約12～16日にピークが観察される。薬物関連毒性は、全く報告されず、何名かの患者で $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ より高い血小板レベルが観察されたものの、血小板増加性事象は、全く観察されなかった。これは、TPOが、ヒトに十分に寛容であることを示す。骨髄抑制された患者では、化学療法後に与えられたPEG化rTPO153 (MGDF) は、化学療法後の血小板最下点の程度を軽減することが示されている〔G. Begley et al., Proceedings of ASCO 15: 271 (1996); M. Fanucchi et al., Proceedings of ASCO 15: 271 (1996)〕。前臨床動物研究で認められたとおり、TPOは、巨核球、赤芽球、骨髄球及び多能性系列の骨髄前駆細胞も拡大する〔S. Vaden-Raj et al., 前掲〕。この後者の所見は、rTPOが初回刺激剤として役立ちうることを示唆する。

#### 【0019】

造血細胞の増殖及び成熟は、多能性幹細胞の増殖と多系列分化とを肯定的又は

否定的に調整する因子によって、厳格に調節されている。これらの効果は、特異的な細胞表面受容体との細胞外タンパク質因子（リガンド）の高親和性結合によって仲介される。これらの細胞表面受容体は、かなりの相同性を共有し、一般的には、サイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーとして分類される。このスーパーファミリーのメンバーは、I L-2（b及びg鎖）[Hatakeyama et al., Science, 244: 551-556 (1989); Takeshita et al., Science, 257: 379-382 (1991)]、I L-3 [Itoh et al., Science, 247: 324-328 (1990); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5459-5463 (1990); Kitamura et al., Cell, 66: 1165-1174 (1991a); Kitamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5082-5086 (1991b)]、I L-4 [Mosley et al., Cell, 59: 335-348 (1989)]、I L-5 [Takaki et al., EMBO J., 9: 4367-4374 (1990); Tavernier et al., Cell, 66: 1175-1184 (1991)]、I L-6 [Yamasaki et al., Science, 241: 825-828 (1998); Hibi et al., Cell, 63: 1149-1157 (1990)]、I L-7 [Goodwin et al., Cell, 60: 941-951 (1990)]、I L-9 [Renault et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5690-5694 (1992)]、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）[Gearing et al., EMBO J., 8: 3667-3676 (1991); Hayashida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 244: 9655-9659 (1990)]、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）[Fukunaga et al., Cell, 61: 341-350 (1990a); Fukunaga et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8702-8706 (1990b); Larsen et al., J. Exp. Med. 172: 1559-1570 (1990)]、EPO [D'Andrea et al., Cell, 57: 277-285 (1989); Jones et al., Blood, 76: 31-35 (1990)]、白血病阻害因子（LIF）[Gearing et al., EMBO J., 10: 2839-2848 (1991)]、オンコスタチンM（OSM）[Rose et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8641-8645 (1991)]に対する受容体、並びにプロラクチン [Boutin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7744-7748 (1988); Edery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2112-2116 (1989)]、成長ホルモン（GH）[Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987)]、及び繊毛神経栄養性因子（CNTF）[Davis et al., Science, 253: 59-63 (1991)]を包含する。

#### 【0020】

サイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーは、三つの機能的範疇にグループ化しうる〔総覧にはNicola et al., Cell, 67: 1-4 (1991)を参照されたい〕。第1群は、一本鎖受容体、例えばエリスロポエチン受容体 (EPO-R) 又は顆粒球コロニー刺激因子受容体 (G-CSF-R) を含み、細胞外ドメインを介して高い親和性でリガンドと結合し、細胞内シグナルも生成する。受容体の第2群は、いわゆるaサブユニットであり、インターロイキン6受容体 (IL6-R)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体 (GM-CSF-R)、インターロイキン3受容体 (IL3-Ra) その他の、サイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーを包含する。これらのaサブユニットは、低い親和性でリガンドを結合するが、細胞内シグナルを変換することができない。シグナルを発しうる高親和性受容体は、aサブユニットと、bサブユニットと呼ばれる、第3群のサイトカイン受容体の一員、例えばIL-3-R、IL-5-R及びGM-CSF-Rの3種類のaサブユニットに対して共通のbサブユニットとの間のヘテロ二量体によって生成される〔Nicola, N.A. et al., Cell 67: 1-4 (1991)〕。

#### 【0021】

mp1がサイトカイン受容体スーパーファミリーの一員である証拠は、配列相同性〔Gearing, EMBO J. 8: 3667-3676 (1988); Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6834-6938 (1990); Davis et al., Science, 253: 59-63 (1991)及びVigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5640-5644 (1992)〕、及びそれが増殖シグナルを変換できることから得られる。

#### 【0022】

マウスc-mp1の分子クローニングから推定されたタンパク質配列は、このタンパク質が他のサイトカイン受容体と同種であることを明らかにした。細胞外ドメインは、465のアミノ酸残基を有し、それぞれ4個の高度に保存されたシステインを有する二つのサブドメインと、N末端サブドメイン及びC末端サブドメインの特定のモチーフとで構成されている。リガンド結合性である細胞外ドメインは、類似のバレルに折り畳まれた構造形態を有することが予測される。この

二重の細胞外ドメインは、IL-3、IL-5及びGM-CSF受容体はもとより、LIFの低親和性結合ドメインにも共通するシグナル変換鎖と高度に相同である〔Vigon et al., Oncogene, 8: 2607-2615 (1993)〕。したがって、mplは、サイトカイン受容体の低親和性リガンド結合群に属する。

#### 【0023】

マウスmplと成熟したヒトmplPとの比較は、これら2種類のタンパク質が、81%の配列同一性を示すことを明らかにする。より具体的には、N末端及びC末端の細胞外サブドメインは、それぞれ、75%及び80%の配列同一性を分かち合う。最も保存されたmpl領域は、91%のアミノ酸同一性を示す細胞質ドメインであって、膜貫通ドメイン付近の37残基の配列が、両種で同一である。したがって、mplは、サイトカイン受容体スーパーファミリーの最も保存されたメンバーの一つであることが報告される〔Vigon, 前掲〕。

#### 【0024】

一定の造血受容体の活性化は、増殖の刺激、分化の刺激、成長の刺激、及びアポトーシスの阻害を包含する、一つ又はそれ以上の効果を生じると考えられる〔Libol et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 248: 378 (1993)〕。リガンド結合した際の造血受容体の活性化は、受容体の二つ又はそれ以上のコピーの二量化によるものでありうる。この二量化を生じる自然に発生するリガンドに加えて、アゴニスト抗体も、架橋結合によってか、さもなければ受容体の二量化を生起することによって受容体を活性化しうる。そのような抗体は、自然リガンドと同じ効能に役立ち、より長い半減期のような好都合な特性を有しうる。エリスロポエチン受容体(EPO-R)を活性化するサイトカイン受容体に対するモノクローナル抗体の例は、国際公開特許第96/03438号公報(1996年2月8日公開)に記載されている。EPO-Rに対するこれらのアゴニスト抗体は、重量に基づく活性が、自然EPOリガンドより約3~4桁程度弱い。

#### 【0025】

細胞、例えば巨核球もしくはその前駆細胞を包含する造血細胞の、増殖、分化及び成熟、並びに／又はアポトーシスの調整を刺激できる分子、特に抗体、そのフラグメント及びその誘導体を、血小板減少症を包含する造血疾患の治療に治療

的に用いるために単離かつ特定する、今後とも持続する必要性が存在する。

【0026】

発明の要約

前記により、巨核球もしくはその前駆細胞を包含する造血細胞の増殖、分化及び／又は成熟を刺激できる、製薬上、もしくは基本的に純粋な抗体もしくはそのフラグメント、又はその誘導体を得ること、並びに造血細胞のアポトーシスを調節することが、本発明の目的である。

【0027】

造血成長因子スーパーファミリーの受容体をin vivoで結合できる、重量に基づいて、自然に存在するリガンドのそれに等しいか、又は2桁より少ない生物学的活性を有する、抗体リガンドを単離することが、本発明の特定の目的である。

【0028】

サイトカインスーパーファミリー受容体 [Nicola et al., Cell, 67: 1-4 (1991)を参照されたい] の三つの機能的範疇のいずれにも結合でき、かつ活性化できる抗体リガンドを単離することも、本発明の目的である。

【0029】

一実施態様では、本発明の目的は、重量に基づいて、自然リガンドの2桁（100）倍以内、好ましくは1桁（10）倍以内強い生物学的活性を有する、造血成長因子スーパーファミリー受容体を活性化する抗体、又はそのフラグメントを提供することによって達成される。好ましくは、該抗体はトロンボポエチン（TPO）受容体を活性化するこの抗体は、アゴニスト抗体と称し、好ましくは哺乳動物のc-mpl、より好ましくはヒトc-mplを含むトロンボポエチン受容体を活性化する。通常、該抗体は、IgG抗体のような完全長の抗体であることになる。適切な代表的フラグメントのアゴニスト抗体は、Fv、ScFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントはもとより、ダイアボディー及び線状抗体も包含する。これらのフラグメントは、例えばある抗体のF<sub>1</sub>又はFc領域、「ロイシンジッパー」、又は半減期を改良もしくは調節するために用いられる、PEG化配列もしくはFc突然変異体などを包含するその他の配列と融合してよい。通常、抗体はヒト抗体であり、親和性について成熟させた抗体を包含する、自然に存

在しない抗体であってよい。c-mplを活性化する代表的な抗体は、12E10、12B5、10F6及び12D5、並びに親和性について成熟させたその誘導体の群から選ばれる。c-mplに対する好適なアゴニスト抗体は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5及びAb6からなる群から選ばれるが、Ab1～Ab6は、それぞれ、VH及びVL鎖を有し、各VH及びVL鎖は、枠組みアミノ酸配列によって分離された、CDR1、CDR2及びCDR3と名付けられた、相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列を有するが、Ab1～Ab6の各VH及びVL鎖での各CDRのアミノ酸配列を、表1に示す。

【0030】

【表2】

表 1			
Ab1:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 5)
タンパク質	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 6)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 11)
タンパク質	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 12)
Ab2:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 17)
タンパク質	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 18)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
タンパク質	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab3:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 29)
タンパク質	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 30)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
タンパク質	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab4:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 33)
タンパク質	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 34)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
タンパク質	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab5:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 40)
タンパク質	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 41)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 23)
タンパク質	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 24)
Ab6:	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 46)
タンパク質	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 45)	(SEQ ID NO: 47)
	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
DNA	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 52)
タンパク質	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 53)

#### 【0031】

本発明のその他の好適なc-mplアゴニスト抗体は、TPOと同様の方式で、ADP、コラーゲンなどと同様な方式で、血小板を活性化するものを包含する。場合により、本発明のc-mplアゴニスト抗体は、血小板を活性化しない。本発明のc-mplアゴニスト抗体は、TPOと同様の方式で用いられる。

#### 【0032】

もう一つの実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体としてサイトカイン受容体又はキナーゼ受容体に結合かつ作用する、実質的に純粋な一本鎖抗体が提供される。

#### 【0033】

本発明は、これらの抗体を得る方法、特にファージ表示抗体、好ましくはヒト一本鎖抗体のライブラリーをスクリーニングする方法も提供する。

#### 【0034】

好適実施態様の詳細な説明

##### 1. 定義

一般的には、下記の単語又は語句は、説明、実施例及び請求項に用いたとき、表示された定義を有する。

#### 【0035】

本明細書に用いたときの用語「アゴニスト」及び「アゴニスト性」は、サイトカインの生物学的活性、又はサイトカイン受容体活性化を、直接もしくは間接的に、実質的に誘導、促進又は強化できる分子を意味もしくは記載する。

#### 【0036】

「アゴニスト抗体」(aAb)は、サイトカインスーパーファミリー受容体に結合し、受容体に生存、増殖、維持及び／又は分化シグナルを生じさせる、抗体もしくはそのフラグメントである。生存シグナルを変換するという定義には、細胞の生存、又はアポトーシスによる死を調整するシグナルが包含される。本発明のアゴニスト抗体は、治療上役立つには、重量に基づいて、自然in vivoリガンドのそれに等しいか、又は2桁(100倍)を下回らない濃度で、生存、増殖、成熟もしくは分化を誘導又は生起できることになる。

#### 【0037】

本明細書に用いられる限りで、「受容体を活性化する」は、成長、生存、増殖、維持及び／又は分化のシグナルを変換するのと可換的に用いられる。

#### 【0038】

本明細書に用いられる限りで、「血小板を活性化する」とは、血小板を刺激して、活性化されていない血小板と比較して、より凝集し易くすることを意味する。例えば、ADP及びコラーゲンは、血小板を活性化することが公知である物質である。

#### 【0039】

「親和性成熟抗体」は、可変領域での一個以上の残基の種類又は位置を変えることによって、その結合親和性及び／又は生物学的活性を増大させた抗体である。変化の例は、CDR又は枠組み領域のいずれかにおいてでありうる、突然変異である。親和性成熟抗体は、代表的には、その結合親和性が、単離されたか、又は自然の抗体もしくはそのフラグメントのそれより2～500倍に増大させてあることになる。好適な親和性成熟抗体は、受容体抗原に対してナノモル又はピコモルもの親和性を有することになる。親和性成熟抗体は、当技術に公知の手順によって産生される。Marks, J.D. et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) は、VH及びVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を記載している。CDR及び／又は枠組み残基のランダム突然変異原性は、Barbas, C.F. et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994)、Schier, R. et al., *Gene* 169: 147-155 (1995)、Yelton, D.E. et al., *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995)、Jackson, J.R. et al., *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995)及びHawkins, R.E. et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992)によって記載されている。

#### 【0040】

「サイトカイン」は、もう一つの細胞に対して細胞間メジエーターとして作用する、単細胞集団が放出するタンパク質についての包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び慣用のポリペプチドホルモンである。サイトカインのうちには、成長ホルモン、インスリン様成長因子、ヒト成長因子、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲



状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロレ  
 ラキシン、濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）及び黄  
 体形成ホルモン（LH）のような糖タンパク質ホルモン、造血成長因子、肝成長  
 因子、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子 $\alpha$   
 （TNF- $\alpha$ 及びTNF- $\beta$ ）、ミューラー阻害物質、マウス性腺刺激ホルモン付  
 随ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子、インテグリン、NG  
 F- $\beta$ のような神経成長因子、血小板成長因子、TGF- $\alpha$ 及びTGF- $\beta$ のよ  
 うな形質転換性成長因子（TGFs）、インスリン様成長因子I及びII、エリス  
 ロポエチン（EPO）、骨誘導性因子、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ のような  
 インターフェロン、マクロファージCSF（M-CSF）、顆粒球マクロファージ  
 CSF（GM-CSF）及び顆粒球CSF（G-CSF）のようなコロニー刺  
 激因子（CSF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-  
 2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-  
 9、IL-11、IL-12のようなインターロイキン（IL）、LIF、SC  
 F及びkitリガンドのようなその他のポリペプチド因子が包含される。本明細  
 書に用いられる限りで、前記の用語は、天然の入手源、又は組換え細胞培養から  
 のタンパク質を包含することが意味される。同様に、用語は、生物学的に活性で  
 ある等価体、例えば1種類もしくはそれ以上のアミノ酸によるアミノ酸配列の相  
 違、又はグリコシル化の形式もしくは程度の相違を包含するものとする。

#### 【0041】

「サイトカインスーパーファミリー受容体」及び「造血成長因子スーパーファ  
 ミリー受容体」は、本明細書では可換的に用いられ、WSXWSドメインをしば  
 しば包含するかなりの相同性を共有し、一般的には、サイトカイン受容体スー  
 パーファミリーのメンバーとして分類される、一群の密接に関連する糖タンパク質  
 細胞表面受容体である〔例えばNicola et al., Cell, 67: 1-4 (1999)及びSkoda  
 , R.C. et al., EMBO J. 12: 2645-2653 (1993)を参照されたい〕。概して、こ  
 れらの受容体は、インターロイキン（IL）又はコロニー刺激因子（CSF）で  
 ある。スーパーファミリーのメンバーは、IL-2（ $\beta$ 及び $\gamma$ 鎖）〔Hatakeyama  
 et al., Science, 244: 551-556 (1989); Takeshita et al., Science, 257: 3

79-382 (1991))、I L-3 [Itoh et al., Science, 247: 324-328 (1990); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5459-5463 (1990); Kitamura et al., Cell, 66: 1165-1174 (1991a); Kitamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5082-5086 (1991b)]、I L-4 [Mosley et al., Cell, 59:335-348 (1989)]、I L-5 [Takaki et al., EMBO J., 9:4367-4374 (1990); Tavernier et al., Cell, 66: 1175-1184 (1991)]、I L-6 [Yamasaki et al., Science, 241: 825-828 (1988); Hibi et al., Cell, 63: 1149-1157 (1990)]、I L-7 [Goodwin et al., Cell, 60: 941-951 (1990)]、I L-9 [Renault et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5690-5694 (1992)]、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) [Gearing et al., EMBO J., 8: 3667-3676 (1991); Hayashida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 244: 9655-9659 (1990)]、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) [Fukunaga et al., Cell, 61:341-350 (1990a); Fukunaga et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8702-8706 (1990b); Larsen et al., J. Exp. Med. 172: 1559-1570 (1990)]、EPO [D'Andrea et al., Cell, 57: 277-285 (1989); Jones et al., Blood, 76: 31-35 (1990)]、白血病阻害因子 (LIF) [Gearing et al., EMBO J., 10: 2839-2848 (1991)]、オンコスタチンM (OSM) [Rose et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8641-8645 (1991)]、並びにプロラクチンに対する受容体 [Boutin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7744-7748 (1988); Ederly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2112-2116 (1989)]、成長ホルモン (GH) [Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987)]、繊毛神経栄養因子 (CNTF) [Davis et al., Science, 253: 59-63 (1991)]及びc-Mpl [M. Souyri et al., Cell 63: 1137 (1990); I. Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5640 (1992)]に対する受容体を包含するが、これらに限定されない。

#### 【0042】

ヒトにおける「血小板減少症」は、血液1リットルあたり $150 \times 10^9$ 未満の血小板数として定義される。

#### 【0043】

「血小板形成活性」は、巨核球もしくは巨核球前駆細胞の、これらの細胞の血小板産生形態への増殖、分化及び／又は成熟を加速することからなる生物学的活性として定義される。この活性は、in vivoでのマウス血小板回復合成アッセイ、ヒト白血病巨核芽球細胞株（CMK）についての抗血小板免疫アッセイ（抗GPIIb/IIIa）によって測定される限りでの血小板細胞表面抗原アッセイの誘導、及び巨核芽球細胞株（DAMI）における倍数化の誘導を包含する様々なアッセイで測定しうる。「トロンボポエチン受容体」は、それに結合するリガンドによって活性化されたとき、細胞、もしくはヒトを包含する哺乳動物での「血小板形成活性」を含むか、生起するか、さもなければ発生する、哺乳動物のポリペプチド受容体である。

#### 【0044】

発現に関係するときの「対照配列」は、特定の宿主生物における操作可能に結合したコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。例えば原核生物に適した、対照配列は、プロモーター、場合によりオペレーター配列、リボソーム結合部位、及びおそらくはその他の、未だ僅かに理解されているにすぎない配列を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが公知である。

#### 【0045】

核酸に関係するときの「作動可能に結合された」は、核酸が、もう一つの核酸配列との機能的関連性にあることを意味する。例えば、ポリペプチドの分泌に参加するプレタンパク質として発現されるならば、プレ配列又は分泌性リーダー用DNAが、ポリペプチドに対するDNAに操作可能に結合されるか；配列の転写に影響するならば、プロモーター又はエンハンサーが、コード配列に操作可能に結合されか；又は翻訳を促進するように位置するならば、リボソーム結合部位が、コード配列に操作可能に結合される。一般に、「作動可能に結合された」は、結合されるDNA配列が、隣接し、分泌性リーダーの場合は、隣接し、かつ読み取り段階にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、隣接している必要はない。結合は、好都合な制限部位での結合によって達成される。そのような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドのアダプター又はリンカーを、慣

用の実施に従って用いる。

【0046】

要素に関係するときの「外来の」は、細胞に対して異種であるか、細胞と同種ではあるが、その要素が通常は見出されない宿主細胞の核酸内の位置にあることを意味する。

【0047】

「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養」は、本明細書では可換的に用いられ、そのような指定は、細胞又は細胞株のすべての子孫を包含する。したがって、例えば「形質転換体」及び「形質転換細胞」のような用語は、最初の主題細胞、及び転移の数に拘わりなくそれから誘導された培養体を包含する。すべての子孫は、故意又は偶然の突然変異のために、DNA含量が厳密に同じでなくともよいことも理解される。初めに形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能又は生物学的活性を有する、突然変異した子孫は、包含される。明確な指定が意図される場合は、文脈から明らかであると思われる。

【0048】

「プラスミド」は、独立した複製起点を有する、自律的に複製する環状DNA分子であり、本明細書では、大文字及び／もしくは数字が先行かつ／又は後続する小文字の「p」によって指定される。本明細書での出発プラスミドは、商業的に入手でき、無制限に公然と入手できるか、又はそのような入手できるプラスミドから、公開された手順に従って構成できるかのいずれかである。加えて、他の同等なプラスミドが、当技術に公知であり、当業者には明白であると思われる。

【0049】

DNAに関係するときの「制限酵素消化」は、DNA配列の一定の位置又は部位でのみ作用するにすぎない酵素による、DNAの内部リン酸ジエステル結合の接触切断を意味する。そのような酵素は、「制限エンドヌクレアーゼ」と呼ばれる。それぞれの制限エンドヌクレアーゼは、2枚折り対称を示す、「制限部位」と呼ばれる特異的なDNA配列を認識する。本明細書に用いられる様々な制限酵素は、商業的に入手することができ、それらの反応条件、ユファクター子その他の、酵素供給者が確立した限りでの必要条件が用いられる。一般的には、制限酵

素は、それぞれの制限酵素がはじめに得られた微生物を表すその他の文字、次いで特定の酵素を指定する数が後続する大文字で構成された略号によって指定される。概して、約1  $\mu$ gのプラスミド又はDNAフラグメントを、緩衝液約20  $\mu$ l中の酵素約1～2単位とともに用いる。特定の制限酵素に適した緩衝液及び基質の量は、製造者によって指定される。通常は、37℃で約1時間のインキュベーションが用いられるが、供給者の指示に従って、変えてもよい。インキュベーション後は、フェノール及びクロロホルムによる抽出によって、タンパク質又はポリペプチドを除去し、消化された核酸は、エタノールによる沈降によって水性分画から回収する。制限酵素による消化の後、末端5'リン酸の細菌アルカリ性ホスファターゼによる加水分解に付して、DNAフラグメントの二つの制限切断された末端が、「環化する」、又は閉じたループを形成して、制限部位でのもう一つのDNAフラグメントの挿入を妨げるようになるのを防いでよい。別途記述されない限り、プラスミドの消化後は、5'末端の脱リン酸に付さない。脱リン酸のための手順及び試薬は、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)の第1. 5. 6～1. 6. 1節に記載されたとおり、慣用的である。

#### 【0050】

制限消化からのDNAの所定のフラグメントの「回収」又は「単離」は、電気泳動によるポリアクリルアミド又はアガロースゲル上の消化物の分離、その移動度の、既知分子量のマーカーDNAフラグメントのそれと対比しての比較による、問題のフラグメントの特定、望みのフラグメントを含有するゲル区画の取出し、及びDNAからのゲルの分離を意味する。この手順は、一般的に公知である。例えば、Lawn et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 6103-6114 (1981)、及びGoedel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980)を参照されたい。

#### 【0051】

「サザン分析」又は「サザンプロット法」は、DNA又はDNA含有組成物の制限エンドヌクレアーゼ消化物中のDNA配列の存在を、既知の標識化されたオリゴヌクレオチド又はDNAフラグメントとのハイブリダイゼーションによって確認する方法である。サザン分析は、代表的には、Sambrook et al.、前掲の第

9. 37～9. 52節に記載されたとおり、アガロースゲル上のDNA消化物の電気泳動分離、電気泳動分離後のDNAの変性、及びニトロセルロース、ナイロンその他の、放射性標識化、ビオチン化又は酵素標識化されたプローブによる分析に適した膜支持体へのDNAの転移を必要とする。

#### 【0052】

「ノーザン分析」又は「ノーザンプロット法」は、オリゴヌクレオチド、DNAフラグメント、cDNAもしくはそのフラグメント、又はRNAフラグメントのような、既知のプローブとハイブリダイズするRNA配列を特定するのに用いられる方法である。プローブは、 $^{32}\text{P}$ のような放射性同位元素でか、又はビオチン化によるか、又は酵素で標識化する。分析しようとするRNAは、通常、Sambrook et al.、前掲の第7. 39～7. 52節に記載されたとおりの当技術に周知の標準的手法を用いて、アガロース又はポリアクリルアミドのゲル上で電気泳動によって分離し、ニトロセルロース、ナイロンその他の適切な膜に転移し、プローブとハイブリダイズさせる。

#### 【0053】

「ライゲーション」は、二つの核酸フラグメント間にリン酸ジエステル結合を形成する工程である。2フラグメントを結合するには、フラグメントの末端は、互いに融和性でなければならない。ある場合には、末端は、エンドヌクレアーゼ消化後に直ちに融和できると思われる。しかし、初めに、エンドヌクレアーゼ消化後に一般的に生成される、食違った末端を、平滑末端に転換して、結合に馴染めるようにすることが必要でありうる。末端を平滑化するには、4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下、適切な緩衝液中で、DNAを約10単位のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、又はT4DNAポリメラーゼで15℃で少なくとも15分間処理する。次いで、DNAを、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈降によって精製する。結合しようとするDNAフラグメントは、ほぼ等モル量で溶液に入れる。溶液は、ATP、リガーゼ緩衝液、及びT4DNAリガーゼのようなリガーゼも、DNA0.5 $\mu\text{g}$ あたり約10単位で含有することになる。DNAをベクターに結合しようとするならば、初めに、ベクターを、適切な制限エンドヌクレアーゼによる消化によって線状化する

。次いで、線状化したフラグメントを、細菌アルカリ性ホスファターゼ、又はウシ腸ホスファターゼで処理して、結合段階の際の自己結合を防ぐ。

#### 【0054】

細胞からのDNAの「調製」は、宿主細胞の培養体からのプラスミドDNAの単離を意味する。DNA調製の常用される方法は、Sambrook et al.、前掲の第1. 25～1. 33節に記載された、大規模及び小規模プラスミド調製である。DNAを調製した後、Sambrook et al.、前掲の第1. 40に記載されたような、当技術に周知の方法によって精製することができる。

#### 【0055】

「オリゴヌクレオチド」は、(1988年5月4日刊行されたヨーロッパ特許第266, 032号公報に記載されたような固相手法を用いるか、又はFroehner et al., Nucl. Acids Res., 14: 5399-5407 (1986)に記載したとおり、中間体のデオキシヌクレオシドHホスホン酸を介しての、リン酸トリエステル、亜リン酸又はアミドリリン酸化学のような) 公知の方法によって化学的に合成される、短鎖の一本鎖又は二本鎖ポリデオキシヌクレオチドである。それ以上の方法は、下記に定義のポリメラーゼ連鎖反応やその他のオートプライマー法、及び固体支持体でのオリゴヌクレオチド合成を包含する。これらの方法はすべて、Engels et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)に記載されている。これらの方法は、遺伝子の核酸配列全体が既知であるか、コードする鎖に相補的な核酸の配列が利用できるならば、用いられる。これに代えて、標的アミノ酸配列が既知であるならば、各アミノ酸残基に対する既知の、かつ好適なコードする残基を用いて、可能な核酸配列を推定してもよい。次いで、オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲル上で精製する。

#### 【0056】

「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」は、1987年7月28日交付された米国特許第4, 683, 195号明細書に記載のとおり、少量の核酸、RNA及び／もしくはDNAの特異的部分を増幅する手順又は手法を意味する。一般に、問題の領域の末端からのか、又はそれ以上の配列情報は、オリゴヌクレオチドプライマーを設計できるように入手することが必要であって；これらのプライ

マーは、増幅しようとする鋳型の相対する鎖と配列が同一であるか、又は類似することになる。二つのプライマーの5'末端は、増幅材料の末端と符合しうる。PCRは、特異的なRNA配列、全ゲノムDNAからの特異的なDNA配列、及び全細胞性RNA、バクテリオファージ又はプラスミドの配列等々から転写されたcDNAを増幅するのに用いることができる。全般的には、Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989)を参照されたい。本明細書に用いられる限り、PCRは、既知の核酸をプライマーとして、かつ核酸ポリメラーゼを用いて、核酸の特異的部分を増幅又は生成することを含む、核酸試験サンプルを増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の一つの、しかし唯一ではない例であると考えられる。

#### 【0057】

「未改変抗体及び免疫グロブリン」は、通常、約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質であって、2本の同一の軽(L)鎖と、2本の同一の重(H)鎖とで構成される。各L鎖は、一つの共有ジスルフィド結合によって1本のH鎖に結合されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンのイソタイプのH鎖間で変動する。各重及びL鎖は、規則的に間隔を置く鎖内ジスルフィド結合も有する。各H鎖は、一端に可変ドメイン( $V_H$ )と、それに続く多数の不変ドメインとを有する。各L鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )と、もう一端に不変ドメインとを有し；L鎖の不変ドメインは、H鎖の最初の不変ドメインと整合し、L鎖の可変ドメインは、H鎖の可変ドメインと整合する。特定の氨基酸残基は、L鎖及びH鎖の可変ドメイン間の境界面を形成すると考えられる[Clothia et al., J. Mol. Biol., 186: 651-663 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-4596 (1985)]。

#### 【0058】

用語「可変」は、可変ドメインの一定の部分は、抗体間で配列が大規模に異なり、その特定の抗原に対する特定の各抗体結合及び特異性に用いられる。しかし、変化は、抗体の可変ドメインの間に均等に分布してはいない。それは、ともにL鎖及びH鎖の可変ドメインにある、相補性決定領域(CDR)又は超可変領域



と呼ばれる3セグメントに集中している。可変ドメインの、より高度に保存された部分は、枠組み (FR) と呼ばれる。H鎖及びL鎖の可変ドメインは、それぞれ、大体は $\beta$ シート立体配置を採り、3個所のCDRによって接合された、4個所のFR領域を含み、それらは、 $\beta$ シート構造を接合し、ある場合には、その一部を形成するループを形成する。各鎖のCDRは、FR領域によって緊密にまとめられ、他方の鎖からのCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)を参照されたい]。不変ドメインは、抗体を抗原に結合することに直接には関与しないが、様々なエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の参加を示す。

#### 【0059】

抗体のパパイン消化は、それぞれ、ただ1個所の抗原結合部位、及び残留「Fc」フラグメント (この名称は、それが容易に結晶化できることを反映している) とともに、「Fab」と呼ばれる二つの相等しい抗原結合フラグメントを生じる。ペプシン処理は、二つの抗原組合せ部位を有し、依然として抗原と架橋結合できる  $F(a b')_2$  フラグメントを生じる。

#### 【0060】

「Fv」は、最小抗体フラグメントであって、完全な抗原認識及び結合部位を有する。この領域は、一つのH鎖及び一つのL鎖可変ドメインが密接に非共有結合で会合した二量体からなる。各可変ドメインの3個所のCDRが、 $V_H-V_L$ 二量体の表面に抗原結合部位を明示するよう作用し合うのは、この立体配置においてである。まとめると、6個所のCDRが、抗原結合特異性を抗体に付与する。しかし、ただ一つの可変ドメイン (又はある抗原に特異的なわずか3個所のCDRを含むにすぎない、Fvの半分) でさえ、結合部位全体より低い親和性ではあるが、抗原を認識かつ結合できる能力を有する。

#### 【0061】

Fabフラグメントは、L鎖の不変ドメイン、及びH鎖の最初の不変ドメイン (CH1) も含む。Fab' フラグメントは、抗体のヒンジ領域からの1個以上のシステインを含む、H鎖CH1ドメインのカルボキシル末端での数個の残基の

追加によって、F a bフラグメントと異なる。F a b' -SHは、F a b' に対する本明細書での命名であって、不変ドメインのシステイン残基が、遊離のチオール基を有する。F (a b')<sub>2</sub>抗体フラグメントは、本来は、それらの間のヒンジのシステインを有する1対のF a b' フラグメントとして形成された。その他の、抗体フラグメントの化学的結合も、公知である。

#### 【0062】

いかなる脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「L鎖」も、その不変ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 $\kappa$ 及び $\lambda$ （1）と呼ばれる、二つの明らかに別個の種類のうち一方に割り振ることができる。

#### 【0063】

そのH鎖の不変ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り振ることができる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、これらのうちいくつかは、サブクラス（イソタイプ）、例えばI g G-1、I g G-2、I g G-3及びI g G-4；I g A-1及びI g A-2に更に区分しうる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応するH鎖不変ドメインは、それぞれ、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及び $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造、及び三次元立体配置は、周知である。

#### 【0064】

用語「抗体」は、広義に用いられ、一つのモノクローナル抗体（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を包含する）、ポリエピトープ性の特異性を有する抗体組成物はもとより、それらが望みの生物学的活性を示す限り、抗体フラグメント（例えばF a b、F (a b')<sub>2</sub>、s c F v及びF v）も具体的に網羅する。

#### 【0065】

本明細書に用いられる限り、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる、自然に発生する潜在的な突然変異以外には同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であって、ただ一つの抗原部位を対象とする。更に、代表的には異なる決定基（エピトープ）を対象とする異なる抗体を含

む、慣用の（ポリクローナル）抗体調製品とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上のただ一つの決定基を対象とする。その特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンに汚染されない、ハイブリドーマ培養によって合成される点が好都合である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られるような抗体の特徴を示し、特定のいかなる方法による抗体の産生を要するとも解してはならない。例えば、本発明に従って用いようとするモノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975)が最初に記載したハイブリドーマ法によって産生しても、又は組換えDNA法〔例えば米国特許第4, 816, 567号明細書 (Cabilly et al.) を参照されたい〕によって産生してもよい。

#### 【0066】

本明細書でのモノクローナル抗体は、H及び／もしくはL鎖の一部が、特定の種に由来するか、又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、あるいは相同であるが、その鎖の残余は、もう一つの種に由来するか、又はもう一つの抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列はもとより、望みの生物学的活性、例えばmplへの結合、及びその活性化を示す限り、そのような抗体のフラグメントにも同一であるか、あるいは相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）〔米国特許第4, 816, 567号明細書 (Cabilly et al.) ；及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)] を特定の包含する。

#### 【0067】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化した」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又は(Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>又はその他の抗体の抗原結合性配列のような)そのフラグメントである。殆どの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（受容者抗体）であるが、但し、受容者の相補性決定領域(CDR)からの残基が、マウス、ラット又はウサギのような、望みの特異性、親和性及び能力を有するヒトではない種（供与者抗体）のCDRからの残基に置き換えられている。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFv枠組み残基が、対応する非ヒト

残基に置き換えられる。そのうえ、ヒト化抗体は、受容者抗体にも、移入CDR又は枠組み配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの変更は、抗体の性能を更に精緻化し、最適化するために施される。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンのそれに相当するCDR領域のすべてか、又は実質的にすべて、及びFR領域のすべてか、又は実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン共通配列のそれである、少なくとも一つ、代表的には二つの可変ドメインの実質的にすべてを含むと思われる。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン不変領域(Fc)、代表的には、ヒト免疫グロブリンのその少なくとも一部を含むと思われる。それ以上の詳細については、Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)を参照されたい。

#### 【0068】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体フラグメントは、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは、一本のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合のための望みの構造を形成できるようにする、ポリペプチドリンカーをV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインの間に更に含む。sFvの総覧には、*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg & Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)中のPluckthunを参照されたい。

#### 【0069】

用語「ダイアボディー」は、二つの抗原結合部位を有する、同じポリペプチド鎖(V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>)中でL鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に接合されたH鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む、小さい抗体フラグメントを意味する。二つのドメイン間の対合を同じ鎖上で許すにはあまりにも短い、リンカーを用いることによって、これらのドメインは、もう一つの鎖の相補的ドメインと対合せざるを得ず、二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディーは、例えばヨーロッパ特許第404,097号公報；国際公開特許第93/11161号公報；及びHollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)に、より詳しく記載されている。

#### 【0070】

本願全体に用いたときの表現「線状抗体」は、Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)に記載の抗体を意味する。略述すると、これらの抗体は、1対の縦列Fdセグメント( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ )を含み、それらが、1対の抗原結合領域を形成する。

#### 【0071】

「変異体」抗体は、本明細書では、アミノ酸配列が、「親」抗体配列中の一つ又はそれ以上のアミノ酸残基の付加、欠失及び／又は置換のために、親抗体のアミノ酸配列と異なる分子を意味する。好適実施態様では、変異体は、親抗体の一つ又はそれ以上の超可変領域での、一つもしくはそれ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、変異体は、親抗体の一つ又はそれ以上の超可変領域での、少なくとも一つ、例えば約1～約10、好ましくは約2～約5の置換を含んでよい。通常、変異体は、親抗体のH又はL鎖可変領域配列との、75%以上の、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列同一性を含むことになる。この配列に関する同一性又は相同性は、本明細書では、配列を整合させ、必要ならば間隙を導入して、配列同一性の最高百分率を達成した後の、候補配列中の、親抗体残基と同一であるアミノ酸残基の百分率として定義される。図1を参照されたい。いかなるN末端、C末端もしくは内部延長、欠失、又は抗体配列への挿入も、配列の同一性又は相同性に影響するとして解してはならない。変異体は、受容体に結合できる能力を保持し、好ましくは、親抗体のそれに優る特性を有する。例えば、変異体は、より強力な結合親和性、受容体を活性化できる強化された能力等々を有してよい。そのような特性を分析するには、例えば、変異体のFab形態を親抗体のFab形態と比較するか、又は変異体の完全長形態を親抗体の完全長形態と比較しなければならないが、それは、抗体の体裁は、本明細書に開示された生物学的活性アッセイでのその活性に強く影響することが見出されているからである。ここで特に問題の変異体抗体は、親抗体と比較したとき、生物学的活性の約10倍以上、好ましくは約20倍以上、最も好ましくは約50倍以上の増強を示すそれである。

#### 【0072】

本明細書での用語「親」は、変異体の調製に用いたアミノ酸配列がコードするそれである。好ましくは、親抗体は、ヒトの枠組み領域を有し、ヒト抗体の不変領域を有する。例えば、親抗体は、ヒト化されたか、又はヒトの抗体であってよい。

#### 【0073】

「単離された」抗体は、その天然の環境の構成部分から特定、分離及び／又は回収されたそれである。その天然の環境の夾雑構成部分は、抗体に対する診断又は治療の利用に干渉するような材料であり、酵素、ホルモンその他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質を包含しうる。好適実施態様では、抗体は、(1) ローリー法によって決定される限りで、95重量%を上回り、より好ましくは99重量%を上回るまで、(2) スピニングカップシークエネーターを用いて、N末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基をうるのに十分な程度まで、(3) クーマシーブルー、又は好ましくは銀染色を用いた還元性もしくは非還元性条件下で、SDS-PAGEによる相同性まで、精製される。単離された抗体は、抗体の自然環境の少なくとも一つの構成部分が存在しないと思われることから、in situで組換え細胞内に抗体を含む。しかし、本来は、単離された抗体は、少なくとも一つの精製段階によって調製されることになる。

#### 【0074】

本明細書に用いたときの用語「エピトープ標識化された」は、「エピトープ標識」に融合された抗体を意味する。エピトープ標識のポリペプチドは、それに対する抗体が産生できるエピトープを与えるのに十分な残基を有するが、抗体の活性に干渉しないように充分短い。好ましくは、エピトープ標識は、それに対する抗体が、他のエピトープと実質的に交差反応しないよう充分に独自である。適切な標識ポリペプチドは、一般的には少なくとも6個のアミノ酸残基、通常は約8～50個のアミノ酸残基（好ましくは約9～30残基）を有する。例は、fluHA標識ポリペプチド、及びその抗体12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)] ; c-myc標識、及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evans et al., Mol. Cell. Biol. 5(12)

:3610-3616 (1985)] ;並びに単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質D (gD) 標識、及びその抗体 [Paborsky et al., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)] を包含する。一定の実施態様では、エピトープ標識は、「サルベージ受容体結合エピトープ」である。本明細書に用いられる限り、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のin vivo血清半減期を延長する役割を有する、IgG分子 (例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>又はIgG<sub>4</sub>) のFc領域のエピトープを意味する。

#### 【0075】

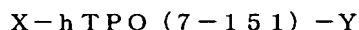
用語「mplリガンド」、「mplリガンドポリペプチド」、「ML」、「トロンプオエチン」又は「TPO」は、本明細書では可換的に用いられ、サイトカイン受容体スーパーファミリーの一員である、mplに結合する特性を有し、mplリガンドの生物学的特性を有するいかなるポリペプチドも包含しうる。例示的な生物学的特性は、ヒトmplをトランスフェクションしたIL-3依存性Ba/F3細胞のDNAへの標識化ヌクレオチド (例えば<sup>3</sup>H-チミジン) の取込を刺激できる能力である。もう一つの例示的な生物学的特性は、マウス血小板反跳アッセイでの、循環血小板への<sup>35</sup>Sの取込みを刺激できる能力である。この定義は、本明細書に記載された無形成性ブタの血漿のようなmplリガンド源からか、もしくはもう一つの入手源、例えばヒトを包含するもう一つの動物種から単離されたか、又は組換えもしくは合成の方法によって調製された、ポリペプチドを包含する。例は、TPO (332) 及びrhTPO<sub>332</sub>を包含する。この定義には、還元性条件下でのSDSゲルによって決定した限りで約31,000ダルトン (31kD) の、また非還元性条件下では28,000ダルトン (28kD) の分子量を有する、国際公開特許第95/28907号公報に記載された血小板形成性リガンドも包含される。用語「TPO」は、変異体形態、例えばフラグメント、対立遺伝子、イソ型、類似体、そのキメラ、及びこれらの形態の混合物を包含する。簡便のため、これらのリガンドのすべてを、以下では単に「TPO」と呼ぶが、この用語が、個々のリガンド及びリガンド混合物すべてを意味することを認識することにする。

#### 【0076】

好ましくは、TPOは、哺乳動物において、血小板形成活性を有するか、又は血清血小板数を増加させることができる化合物である。TPOは、好ましくは、固有血小板数を少なくとも10%、より好ましくは50%増加させることができ、最も好ましくは、ヒトにおける血小板数を血液1リットルあたり約 $150 \times 10^9$ を上回るまで増加させることができる。

#### 【0077】

本発明のTPOは、好ましくは、高度に精製された実質的に均質なbpmplリガンドポリペプチドのアミノ酸配列とは、少なくとも70%の全体的配列同一性を有し、bpmplリガンドポリペプチドの「EPOドメイン」とは、少なくとも80%の配列同一性を有する。これに代えて、本発明のTPOは、成熟したヒトbplリガンド(hML)、又はその変異体、もしくは転写後修飾された形態、あるいは成熟ヒトbplリガンドとの約80%の配列同一性を有するタンパク質であってもよい。これに代えて、TPOは、成熟ヒトbplリガンドのフラグメント、特にアミノ末端又は「EPOドメイン」のフラグメントであってよい。好ましくは、アミノ末端フラグメントは、第1及び第4システイン残基間のヒトML配列の実質的にすべてを保持しているが、その領域外では、実質的な付加、欠失又は置換を含んでよい。この実施態様によれば、フラグメントポリペプチドは、式：



によって表しうる。

#### 【0078】

上式中、hTPO(7-151)は、両端を含めて、Cys<sup>7</sup>からCys<sup>151</sup>までのヒトTPO(hML)アミノ酸配列を表し；Xは、成熟TPO、又はそれへの、Met、Lys、Tyrのようなアミノ酸残基の延長の、Cys<sup>7</sup>のアミノ基、又は一つもしくはそれ以上のアミノ末端アミノ酸残基、あるいは、又はアルギニンからリシンへのようなその置換、又は例えばタンパク質分解による切断部位を有するリーダー配列（例えば因子Xa又はトロンビン）を表し；Yは、成熟TPO又はそれへの延長の、Cys<sup>151</sup>のカルボキシル末端基、又は一つもしくはそれ以上のカルボキシル末端アミノ酸残基を表す。



#### 【0079】

「TPOフラグメント」は、天然に産する成熟した完全長のmp1リガンドの一部、又は一つもしくはそれ以上のアミノ酸残基又は炭水化物単位が欠失したTPO配列を意味する。アミノ酸残基の欠失は、フラグメントが、mp1リガンドに共通する少なくとも一つの生物学的特性を共有する限り、N末端もしくはC末端のいずれか、又は内部も包含する、ペプチドのどこで生じてもよい。mp1リガンドフラグメントは、代表的には、無形成性ブタ血漿から単離されたリガンド、又はヒトもしくはマウスのリガンド、特にそのEPOドメインを包含する哺乳動物から単離された、mp1リガンドの配列と同一である、少なくとも10、15、20、25、30又は40アミノ酸残基の連続する配列を有すると思われる。N末端フラグメントの代表的な例は、TPO(153)、hML<sub>153</sub>又はTPO(Met<sup>-1</sup>1-153)である。

#### 【0080】

用語「TPOイソ型」及び「TPO配列イソ型」、又はTPOに付随しての用語「誘導体」等々は、本明細書に用いられる限り、組換え細胞培養、無形成性ブタ血漿、又はヒトmp1リガンドから単離されたTPOとの100%未満の配列同一性を有する、下記に定義されたとおりの生物学的活性材料を意味する。通常は、生物学的活性mp1リガンド、又はTPOイソ型は、無形成性ブタ血漿もしくは成熟マウスから単離されたmp1リガンド/TPO、ヒトmp1リガンド、又はそのフラグメントとの約70%以上、好ましくは約75%以上、より好ましくは約80%以上、更に好ましくは約85%以上、はるかに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有することになる。

#### 【0081】

TPO「類似体」は、TPOポリペプチドを様々な非タンパク質性重合体、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール又はポリオキシアルキレンのうち一つに、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号明細書に説明された方式で結合することによる、T

P O又はm p lリガンドの共有結合による修飾を包含する。前記重合体に共有結合で結合されたT P Oポリペプチドは、本明細書ではP E G化T P Oと呼ぶ。

#### 【0082】

本発明の更に別の好適なT P Oポリペプチドは、m p lリガンド配列の変異体及びキメラを包含する。通常、好適なm p lリガンド配列の変異体及びキメラは、ヒトm p lリガンドとの90%以上、最も好ましくは95%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。例としての好適なm p lリガンド変異体は、N末端ドメインhML変異体（エリスロポエチンとのその配列相同性のため、「E P Oドメイン」と呼ばれる）である。好適なhMLのE P Oドメインは、成熟hMLの初めのほぼ153個のアミノ酸残基を含み、hML<sub>153</sub>と呼ばれる。場合により好ましいhML配列変異体は、C末端ドメインの一つ以上の塩基性又は二塩基性アミノ酸残基が、非塩基性アミノ酸残基（例えば、疎水性、中性、酸性、芳香族、G l y、P r oなど）で置換されたそれを含む。好適なhMLのC末端ドメイン配列変異体は、第153及び154 A r g残基が、A l a残基に置き換えられている。この変異体は、hML<sub>332</sub>（R153A、R154A）と呼ばれる。

#### 【0083】

好適なキメラは、異種ポリペプチド、又はそのフラグメントとのm p lリガンド、又は（下記に定義された）そのフラグメントの間の融合である。例えば、hML<sub>153</sub>は、I g Gフラグメントと融合させて、血清半減期を改良するか、又はI L-3、G-C S FもしくはE P Oと融合させて、増強された血小板形成活性、又はキメラ性の造血活性を有する分子を生成してよい。

#### 【0084】

その他の好適なm p lリガンドフラグメントは、アミノ末端S e rの前にM e tを有する（例えばM e t<sup>-1</sup>T P O<sub>153</sub>）。これは、例えば、大腸菌のような微生物中で、タンパク質を直接発現させるときに、好適である。場合により、これらのm p lリガンドフラグメントは、誘導体形成を容易にするために、アミノ酸置換を有してもよい。例えば、炭水化物ドメインのA r g<sub>153</sub>その他の残基を、L y sに置き換えて、ポリエチレングリコールを付加するための追加の部位を生

成してもよい。この選択肢による好適なmp1リガンドフラグメントは、Met<sup>-1</sup>TPO(1-X)〔ここで、Xは、第1〜X残基の配列に対して約153、164、191、199、205、207、217、229又は245である〕を包含する。その他の好適なmp1リガンドフラグメントは、精製されたリガンドの化学的又は酵素的加水分解もしくは消化の結果として生成されたものを包含する。

#### 【0085】

「本質的に純粋な」タンパク質は、汚染するタンパク質その他の細胞成分を除去するよう精製された組成物を意味し、好ましくは、組成物の総重量を基準にして、約90重量%以上のタンパク質、より好ましくは約95重量%以上を含む。

「本質的に均質な」タンパク質は、組成物の総重量を基準にして、約99重量%以上のタンパク質を含む組成物を意味する。

#### 【0086】

##### II. 発明の好ましい実施態様

一つの実施態様において、本発明の好ましい抗体は、造血系増殖因子受容体スーパーファミリーのメンバーであるc-mplに結合し、生存、増殖、成熟及び／又は分化のシグナルを伝達する性質を保持する、アゴニスト抗体(aAb)と呼ばれる、実質的に均質な抗体及びそれらの変異体である。そのようなシグナル伝達は、ヒトmplPでトランスフェクトされたIL-3依存性Ba/F3細胞のDNAへの標識されたヌクレオチド(<sup>3</sup>H-チミジン)の取り込みの刺激を測定することにより、又は血小板抗原GPIIb/IIIa発現の誘導を測定するCMKアッセイを用いて決定されうる。シグナル伝達は、c-mpl/MabHUE-03細胞増殖アッセイ又は液体懸濁液巨核球生成アッセイにおいて、c-mpl-Rse.gDキメラ受容体のリン酸化を測定することにより、KIRALELISAによっても決定されうる。

#### 【0087】

好ましい本発明のc-mplアゴニスト抗体は、重量に基づきトロンボポエチンの濃度と同等の濃度又は2桁(100倍)以上低い濃度で、CD34+細胞の生存、増殖、成熟又は血小板産生型への分化を誘導し又は引き起こすこともでき

る。

【0088】

より好ましいc-mpl aAb (一つ又は複数)は、造血活性、特に巨核球生成又は血小板生成の活性を有する、即ち、未成熟の巨核球又はその前駆細胞の増殖、成熟、及び/又は重量に基づきrhTPOの活性と同等又は2桁以内の大きさの生物学的活性を示す、成熟血小板産生型への分化を刺激することができる、実質的に精製されたaAb (一つ又は複数)である。最も好ましい本発明のaAb (一つ又は複数)は、完全なヒトFc領域を有する全長抗体を含み、造血、巨核球生成又は血小板生成の活性を有するそれらの断片を含む、ヒトaAb (一つ又は複数)である。前述の生物学的活性を有する例示的な断片には、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>が含まれる。

【0089】

好ましいscFv断片は、図1に提供されたCDR及び枠組み領域の配列を有する、10F6、5E5、10D10、12B5、12D5及び12E10と名付けられた断片である。代替的には、上記に列挙されたscFvは、一つ又は複数のCDR及びCDR間の枠組み領域における1〜3個のアミノ酸残基の変異により親和性成熟 (affinity matured) される。

【0090】

枠組み領域は、「コンセンサス配列」(即ち、ヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖のクラス、サブクラス又はサブグループの最も共通のアミノ酸)に由来していてもよいし、又は個々のヒト抗体枠組み領域もしくは異なる枠組み領域配列の組み合わせに由来していてもよい。多くのヒト抗体枠組み領域配列が、例えば、カバット (Kabat) ら、免疫関連タンパク質の配列 (Sequence of Proteins of Immunological Interest) 第5版 (公衆衛生総局 (Public Health Service)、国立衛生研究所 (National Institute of Health)、ベセスダ (Bethesda)、メリーランド州 (MD) (1991)) の647〜669頁に集められている。

【0091】

mpl抗体を精製するための適当な方法は、精製すべきmpl抗体分子が選択的に固定化受容体ポリペプチドに吸着されるよう、mpl抗体分子を含む抗体源

を固定化受容体ポリペプチド、特にm p l又はm p l融合ポリペプチドと接触させること、吸着していない材料を除去するため固定化支持相を洗浄すること、及び溶出緩衝液で固定化受容体ポリペプチドから精製すべき分子を溶出させることを含む。m p l抗体を含む供給源は、異なる結合エピトープを有する抗体のライブラリーであってよく、受容体は既知の方法を用いてプレート、チューブ、粒子又はその他の適当な表面に固定化されうる。

#### 【0092】

代替的には、抗体を含む供給源は、培養培地又は細胞溶解物のいずれかにおける抗体の濃度が一般的に血漿又はその他の天然供給源における濃度よりも高い、組換え細胞培養物である。実質的に均一な抗体を提供するための好ましい精製法は、例えば遠心分離又は限外濾過により粒子片、宿主細胞又は溶解断片のいずれかを除去し（場合により、市販品を入手可能なタンパク質濃縮フィルターによりタンパク質を濃縮してもよい）、その後、イムノアフィニティ、イオン交換（例えば、DEAE又はカルボキシメチル基もしくはスルホプロピル基を含むマトリックス）、ブルーセファロース（Blue-SEPHAROSE）、CMブルーセファロース（CM Blue-SEPHAROSE）、モノ-Q（MONO-Q）、モノ-S（MONO-S）、レンズマメ・レクチンセファロース（lentil lectin-SEPHAROSE）、WGAセファロース（WGA-SEPHAROSE）、ConAセファロース（ConA-SEPHAROSE）、エーテル・トイパール（Ether TOYPEARL）、ブチル・トイパール（Butyl TOYPEARL）、フェニル・トイパール（Phenyl TOYPEARL）、プロテインAセファロース（Protein A SEPHAROSE）、SDS-PAGE、逆相HPLC（例えば、脂肪族基が付加したシリカゲル）又はセファデックス・モレキュラーシーブ（SEPHADEX molecular sieve）又はサイズ排除クロマトグラフィー、及びエタノール沈殿又は硫酸アンモニウム沈殿より選択される一つ又は複数の工程により、その他の不純物から抗体を分離することを含む。プロテアーゼ分解を阻害するため、前記工程のいずれかに、メチルスルホニルフルオリド（PMSF）のようなプロテアーゼ阻害剤が含まれていてもよい。

#### 【0093】

好ましくは、単離された抗体はモノクローナル（Kohler及びMilstein, Nature

, 256: 495-497 (1975); Campbell, 生化学及び分子生物学における実験技術 (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology), Burdonら編, 第13巻, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); 並びにHuseら, Science, 246: 1275-1281 (1989))である。好ましいm p l抗体は、少なくとも約 $10^6$  l/モルの親和性でm p l受容体に結合するものである。より好ましくは、抗体は、少なくとも約 $10^7$  l/モル又は少なくとも約 $10^9$  l/モルすらの親和性で結合する。最も好ましくは、抗体は、前述のエフェクター機能の一つを有するm p l受容体に対して作製される。m p l受容体に結合することができる単離された抗体は、場合により、第二のポリペプチドと融合していてもよく、抗体又はそれらの融合体は、固定化m p lポリペプチドに関して前述したように、供給源からm p lを単離及び精製するために用いられうる。この実施態様の更に好ましい面において、本発明は、リガンドを含む可能性がある試料、特に血清試料に抗体を接触させること、及び結合が起こったか否かを検出することを含む、m p lリガンドをin vitro又はin vivoで検出するための方法を提供する。

#### 【0094】

本発明は、検出可能な基で標識されていても、されていなくてもよい、m p l抗体又はそれらの断片をコードする単離された核酸分子、及びm p l抗体をコードする配列を有する核酸分子と、相補的であるか、又は高度もしくは中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする配列を有する核酸分子も提供する。好ましいm p l抗体核酸は、生物学的活性を有するヒト抗体をコードするRNA又はDNAである。

#### 【0095】

更に好ましい本発明の実施態様において、核酸分子はm p l抗体をコードするc DNAであり、c DNAがベクターで形質転換された宿主により認識される制御配列と作用可能に連結している複製可能なベクターを更に含む。この面は、ベクターで形質転換された宿主細胞、並びに形質転換された宿主細胞の培養物において抗体をコードするc DNAを発現させること、及び宿主細胞培養物から抗体を回収することを含む、抗体の産生を行うc DNAを使用する方法を更に含む。このようにして調製された抗体は、好ましくは、実質的に均一なヒト抗体である。

。抗体を作製するための好ましい宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。別の好ましい宿主細胞は、E. coliである。

#### 【0096】

本発明は、治療に有効な量のmplアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を哺乳動物に投与することを含む、免疫系又は造血系の疾患、特に血小板減少症を有する哺乳動物を治療するための好ましい方法を更に含む。場合により、抗体は、サイトカイン、特にコロニー刺激因子又はインターロイキンと組み合わせて投与される。好ましいコロニー刺激因子又はインターロイキンには、キット・リガンド、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9又はIL-11が含まれる。代替的には、抗体は、インシュリン様増殖因子（例えば、IGF-1）又は腫瘍壊死因子（例えば、リンボトキシン（LT））と組み合わせて投与される。

#### 【0097】

##### III. 調製方法

本発明のアゴニスト及び／又はアンタゴニスト抗体をコードする核酸は、バクテリオファージ上に示される一本鎖抗体のライブラリーから、調製することができる。そのようなライブラリーの調製は、当業者には周知である。適切なライブラリーは、WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438及びWO95/15388に記載されている方法により調製してもよい。好適な実施態様において、一本鎖抗体（scFv）のライブラリーは、ヒトのドナーからのヒトのB-細胞の多様な集団から生成されてもよい。VH及びVL抗体鎖に相当するmRNAは、単離され、そして標準技術を用いて精製され、そして逆転写され、cDNAの集団を生成させる。PCR増幅後、一本鎖抗体をコードするDNAは、Gly<sub>4</sub>Se<sub>r</sub>のようなリンカーを用いて組み立てられ、そして適切な発現ベクター中にクローン化される。次いで、ファージライブラリーは、一本鎖抗体の集団がファージの表面に示されるように調製される。ファージライブラリーを調製するための適切な方法は、Winter et. al., Annu. Rev. Immunol., 1994,

12: 433-55; Soderlind et. al., Immunological Reviews, 1992, 130: 109-123; Hoogenboom, Tibtech February 1997, Vol. 15; Neri et. al. Cell Biophysics, 1995, 27: 47-61 及びそこに記載された参照類に、概観され、記載されている。

#### 【0098】

アゴニスト及びアンタゴニスト特性を有する本発明の抗体は、受容体を固定し、そして抗体を結合するための固定化受容体を用いて、上述されたように調製されたヒト s c F v のライブラリーを選び分けることにより選択されてもよい。Griffiths et. Al., EMBO-J, 1993, 12: 725-734. 特異的クローンの特異性及び活性は、既知の評価法を用いて評価することができる。Griffiths et. al.: Clarkson et. al. Nature. 1991, 352: 642-648. 初めの選り分け工程の後、受容体への改良された結合を有するファージ上に示される複数の異なる一本鎖抗体を含むファージのライブラリーを得る。引く続く選り分け工程は、より高い結合親和性を有する付加的なライブラリーを提供する。結合活性効果が問題であるとき、一価ファージ提示ライブラリーは、ファージの20%未満、好適には10%未満、更に好適には1%未満が、ファージの表面の抗体の1つ以上のコピーを示すように用いることができる。一価の表示は、例えばLowman et. al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 1991, 3(3): 205-216に記載されたようにファージミド及びヘルパーファージの使用で達成することができる。好適なファージは、M13であり、そして提示は、上記のLowman et. al.,に記載のように、好適にはコートタンパク質3を有する融合タンパク質として存在する。他の適切なファージは、f1及びfd繊維状ファージを含む。他のウイルスコートタンパク質を有する融合タンパク質の表示は、また既知であり、本発明で用いてもよい。U. S. 5, 223, 409参照。

#### 【0099】

抗体のアミノ酸配列の変異体は、適当なヌクレオチドの変化を抗体DNAへ導入することによるか、又はペプチド合成により調製される。そのような変異体は、例えばここでの実施例の抗体のアミノ酸配列中の、残基からの欠損、及び/又は残基中への挿入及び/又は残基の置換を含む。目的構造体が、所望の特性を有



するならば、欠損、挿入及び置換の如何なる組み合わせも目的構造体に到達することができる。アミノ酸の交換は、例えばグリコシル化部位の数又は位置をそのように変えて、ヒト化抗体又は変異体抗体の転写後のプロセスを改変してもよい。

#### 【0100】

突然変異生成のための好適な位置である、抗体のある種の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085(1989)に記載されているように「アラニン精査突然変異誘発 (alanine scanning mutagenesis)」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基は、同定 (例えば、arg, asp, his, lys、及びgluのような帯電された残基) され、そして中性又は負に帯電されたアミノ酸 (最も好適にはアラニン又はポリアラニン) により置きかえられ、受容体とアミノ酸の相互作用に影響を及ぼす。次いで、置換に対して官能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、更なる又は他の変異体を、置換部位で又は置換部位のために、導入することにより純化される。したがって、アミノ酸配列変異体を導入するための部位は、予め決められるが、突然変異それ自体の性質は、予め決める必要はない。例えば、与えられた部位で突然変異の効果を分析するために、アラニン精査又はランダム突然変異誘発が、標的コドン又は領域で行われ、発現された抗体変異体が、所望の活性のためにスクリーニングされる。

#### 【0101】

アミノ酸配列挿入は、1個の残基から100又はそれ以上の残基の長さの範囲でのアミノ-及び/又はカルボキシル-末端融合、並びに1個又は複数個のアミノ酸残基の内部配列の挿入を含む。末端挿入の例は、N-末端メチオニル残基を有する抗体又はエピトープ標識に融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増大させる、酵素又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

#### 【0102】

変異体の別のタイプは、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、除去された抗体分子中に少なくとも一つのアミノ酸残基及びその場所に挿入された異

なる残基を有する。置換突然変異誘発のための最も大きな挿入の部位は、超可変異領域を含むが、FR改変も、観察されている。保存置換は、「好適な置換」の標題で下で表2に示されている。そのような置換が、生物学的活性を変化させるならば、そのとき、表2中で「典型的な置換基」の標題で示されているか、又は引例中にアミノ酸の分類に対する参照として下記に更に記載されているように、更なる置換の変化は、導入されてよく、そして生成物がスクリーニングされる。

【0103】

【表3】

表 2

もとの残基	典型的な置換基	好ましい置換基
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

【0104】

抗体の生物学的な特性における根本的な改変は、(a) 例えばシートやらせん構造のような、置換領域内でのポリペプチド骨格の構造、(b) 目標部位の分子の電荷や疎水性又は(c) 側鎖の束、の維持に及ぼす影響が有意に異なる置換基を選択することによって達成される。自然由来の残基は共通する側鎖の特性によってグループ分けされる：

- (1) 疎水性: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性親水性: cys, ser, thr;
- (3) 酸性: asp, glu;
- (4) 塩基性: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 側鎖の向きに影響する残基: gly, pro;及び
- (6) 芳香性: trp, tyr, phe。

#### 【0105】

非保存的置換は、これらのクラスのひとつの構成物を他のクラスに変えることをともなうであろう。

#### 【0106】

分子の酸化安定性を改善し、異常な交差結合を避けるため、ヒトの又は種々の抗体の好ましい構造の維持に含まれない、いかなるシステイン残基も、一般的にセリンに置換され得る。逆にいえば、(特に抗体がF<sub>v</sub>フラグメントのような抗体フラグメントである場合に)システイン結合は抗体にその安定性を添加しうる。

#### 【0107】

特に好ましい型の置換変異体は、1つ以上の親の抗体の超可変領域残基を含んでいる。一般的に、さらなる発達のために選択される結果物変異体は、それらが産生された親の抗体(ヒト化又はヒトの抗体)に比べると、改善された生物学的特性を有する。このような置換変異体を得る簡便な方法は、この技術において既知の方法を用いるファージを用いる親和性成熟である。つまり、いくつかの超可変部位(例えば3-7部位)は突然変異によって、各々の部位ですべての可能なアミノ置換を産するのである。こうして産生される抗体変異体は、それぞれの粒子の中に詰められたM13の遺伝子I<sub>II</sub>Iの産物に融合したフィラメント状のファージ粒子から一価型で提示される。その後、このファージに提示された変異体は、本願において開示されたそれらの生物学的活性(例えば結合親和性)によってスクリーニングされる。修飾するために、候補の超可変部位を同定するため、アラニン精査突然変異誘発を、同定された、抗原結合に大きく貢献する超可変領域残基に対して実施することができる。代替的に、又は付加的に、抗原と受容体

の間の接触部位を同定するため、抗原-抗体複合体の結晶構造を解析することが有益であろう。このような接触残基と隣接する残基は、ここに築き上げられた技術による置換の候補である。一度そのような変異体が産生されれば、ここに記されたように変異体のパネルはスクリーニングの対象となり、関連する1つ以上のアッセイにおいて優れた特性を有する抗体が、さらなる開発のために選択されるであろう。

#### 【0108】

抗体の他のタイプのアミノ酸変異体は、抗体の元来のグリコシル化パターンを変更する。変更するということは、抗体の中に見られる1つ以上の炭水化物部位の欠失及び/又は抗体中には存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。

#### 【0109】

抗体のグリコシル化は、典型的にはN-結合又はO-結合である。N-結合はアスパラギン残基の側鎖への炭水化物の結合に言及する。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（ここで、Xはプロリンを除く、いかなるアミノ酸でもよい）はアスパラギン側鎖に対する炭水化物の酵素的付加の認識配列である。即ち、あるポリペプチドにおける、これらのいずれか一方のトリペプチド配列の存在は潜在的なグリコシル化部位を作り出すのである。O-結合グリコシル化は、糖類即ちN-アセチルガラクトースアミン、ガラクトース又はキシロースのうちの1つをヒドロキシアミノ酸、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリシンもまた用いられ得るが、最も一般的にはセリン又はトレオニン、に結合することに言及する。

#### 【0110】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、（N-結合のグリコシル化部位のためには）簡便にはアミノ酸配列を1つ以上の上記のトリペプチド配列を含むように改変することによって達成される。改変は、（O-結合のグリコシル化部位のためには）1つ以上のセリン又はトレオニン残基の、もとの抗体の配列への付加又は置換によってもまた起こすことができる。

#### 【0111】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この技術分野で既知の種々の方法で調製することができる。これらの方法は、それに限定されるわけではないが、天然の供給源からの単離（自然発生的なアミノ酸配列変異体の場合）、又は先に調製された変異体又は非変異体型の抗体のオリゴヌクレオチド仲介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発を含む。

#### 【0112】

好適には、抗体は、抗体の核酸を発現するように形質転換された（典型的には、発現ベクターによって形質転換された）細胞の培養及び培養細胞の細胞から抗体を取り戻すことによる抗体の産生を含む、標準的な組み換え手法で調製する。

#### 【0113】

上記により選択された、m p l 抗体遺伝子をコードする核酸（例えばc DNA又はゲノミックDNA）、更なるクローニング（DNAの増幅）又は発現のために複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターが適用可能であり、好適なベクターの選択は（1）DNA増幅又はDNA発現に使えるものであるか、（2）ベクターに挿入される核酸の大きさ、（3）そのベクターにより形質転換される宿主細胞、によってなされるであろう。各々のベクターはその機能（DNA増幅又はDNA発現）及びそれが共存し得る宿主細胞に応じて種々の組成を含む。ベクターの組成は、それに限定されるわけではないが、一般的に以下の1つ以上を含む：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。

#### 【0114】

##### （i）シグナル配列構成要素

本発明のm p l 抗体は直接的に発現されうるのみならず、非相同ポリペプチド、好ましくは成熟タンパク質又はポリペプチドのN末端に特定の分割部位をもつシグナル配列又はその他のポリペプチドとの融合としても発現されうる。一般に、シグナル配列は、ベクターの1構成要素であってもよいし、又はベクター内に挿入されるm p l 抗体DNAの一部であってもよい。選択された非相同シグナル配列は、宿主細胞によって認識され処理される（即ちシグナルペプチダーゼによ

って分割される) ものなくてはならない。原核宿主細胞については、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1 p p 又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーのグループの中から原核シグナル配列が選択される。酵母分泌のためには、未変性シグナル配列を、例えば酵母インベルターゼ、アルファ因子又は酸性ホスファターゼ、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日に公示されたEP362, 179号)、又は1990年11月15日に公示されたW090/13646号に記述されているシグナルで置換することが可能である。哺乳動物細胞の発現においては、未変性シグナル配列 (即ち、in vivo でその未変性哺乳動物細胞からm p l リガンドの分泌を通常導くm p l リガンドブレ配列) が充分であるが、その他のm p l リガンドポリペプチド又は異なる動物種からの同じm p l からのシグナル配列、m p l リガンドからのシグナル配列及び同じ又は関係する種の分泌されたポリペプチドからのシグナル配列、ならびに例えば、単純ヘルペスg Dシグナルといったウイルス分泌リーダーといったように、その他の哺乳動物のシグナル配列も適切でありうる。

#### 【0115】

##### (ii) 複製起点構成要素

発現及びクローニングの両方のベクターが、一つ以上の選択された宿主細胞内でのベクターの複製を可能にする核酸配列を含有している。一般に、クローニングベクター内では、この配列は、宿主染色体DNAとは独立してベクターが複製するのを可能にする配列であり、複製起点又は自律的に複製する配列を内含する。かかる配列は、さまざまな細菌、酵母及びウイルスについて周知のものである。プラスミドpBR322からの複製起点は、大部分のグラム陰性菌に適しており、2  $\mu$  のプラスミド起点は酵母に適し、哺乳動物細胞内のクローニングベクターのためには、さまざまなウイルス起点 (SV40, ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV) が有用である。一般に、複製起点構成要素は哺乳動物発現ベクターのためには必要とされない (標準的にはSV40起点を使用することができるが、これは、それが早期プロモータを含んでいるからである)。

#### 【0116】

大部分の発現ベクターは「シャトル」ベクターである。即ち、これらは1つ以

上のクラスの生体内で複製能力をもつが、発現のためもう1つの生体内にトランスフェクションされうる。例えば、ベクターを*E. coli*の中でクローニングし、次に、たとえそれが宿主細胞染色体とは独立して複製する能力をもたなくても、発現のため酵母又は哺乳動物細胞内にトランスフェクションさせる。

#### 【0117】

宿主ゲノム内への挿入によってDNAも同様に増幅可能である。これは、例えば、*Bacillus*ゲノミックDNA中に見られる配列に相補的なDNA配列をベクター内に含み入れることによって、宿主として*Bacillus*種を用いて容易に達成される。このベクターを用いた*Bacillus*のトランスフェクションは、結果として、ゲノムとの相同的組換え及び抗体DNAの挿入をもたらす。しかしながら抗体をコードするゲノミックDNAの回収は、抗体DNAを切除するのに制限酵素消化が必要とされることから、外因的に複製されたベクターの回収よりも更に複雑である。

#### 【0118】

##### (iii) 選択遺伝子構成要素

発現及びクローニングベクターは、選択性マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含んでいなければならない。この遺伝子は、選択培地内で成長させられた形質転換済みの宿主細胞の存続又は成長に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含むベクターと形質転換されない宿主細胞は、培地内で存続しなくなる。標準的な選択遺伝子は、例えば*Bacilli*のための遺伝子コード化D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子といったように、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート又はテトラサイクリンといった抗生物質又はその他のトキシンに対する抵抗性を付与し、(b) 栄養素要求体欠損を相補するか又は(c) 複合培地からは入手できない重要な栄養分を供給するタンパク質をコードする。

#### 【0119】

選択スキームの一例では、宿主細胞の成長を阻止するための薬物が利用される。非相同性遺伝子でうまく形質転換されるこれらの細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を発現し、かくして選択管理を生きのびる。かかる優性選択の例では、ネオマイシン (Southern et al., *J. Molec. Appl. Genet.*, 1; 327 (1982))

、マイコフェノール酸 (Mulligan et al., Science, 209; 1422 (1980)) 又はハイグロマイシン (Sugden et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)) といった薬物が用いられる。上に記した3つの例は、それぞれ適切な薬物、G 4 1 8 又はネオマイシン (ゲネティシン)、x g p t (ミコフェノール酸) 又はハイグロマイシンに対する耐性を伝えるため真核性制御下にある細菌遺伝子を利用する。

#### 【0120】

哺乳動物細胞のためのその他の適切な選択性マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 又はチミジンキナーゼといったような抗体核酸をとり込む応用能のある細胞の同定を可能にするものがある。哺乳動物細胞の形質転換体は、マーカーを取り込んだために形質転換体だけが存続する適合性をもつ淘汰圧下に置かれる。淘汰圧は、培地内の選択作用物質の濃度がうまく変更されかくして抗体をコードするDNA及び選択遺伝子の両方の増幅を導くことになる条件下で形質転換体を培養することによって課せられる。増幅は、成長にとってきわめて重要なタンパク質の産生のために需要が更に大きい遺伝子が、組換え型細胞の後続世代の染色体内で連繫して反復させられるプロセスである。

#### 【0121】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞はまず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキサート (M t x) を含有する培地内ですべての形質転換体を培養することによって同定される。野生型DHFRが利用されるときに適切な宿主細胞は、Urlaub及びChasin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4 216 (1980)により記述されているように調製され増殖された、DHFR活性の欠損したチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系統である。形質転換された細胞はこのとき、増大したレベルのM t xに露呈される。こうして、DHFR遺伝子の数多くのコピーそしてそれに付随して、抗体をコードするDNAといった発現ベクターを含むその他のDNAの多数のコピーの合成が導かれる。この増幅技術は、例えばM t xに対し高い耐性をもつ突然変異体DHFR遺伝子が利用される場合 (EP 1 1 7, 0 6 0) の内因性DHFRの存在にもかかわらず、例えば ATCC No. CCL 6 1 CHO-K 1 といったその他の形で適切であるあ



らゆる宿主とともに使用することも可能である。代替的には、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質及びアミノグリコシド3ホスホトランスフェラーゼ（APH）といったもう1つの選択性マーカーで形質転換又は同時形質転換された宿主細胞（内因性DHFRを含有する特に野生型の宿主）を、例えばカナマイシン、ネオマイシン又はG418といったアミノグリコシド抗体といった選択性マーカーのための選択作用物質を含有する培地内での細胞の成長によって選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照のこと。

#### 【0122】

酵母内で使用するための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7内に存在するtrp1遺伝子である（Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); 又はTschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)。trp1遺伝子は、例えば、ATCC No. 44076又はPEP4-1のように、トリプトファン内での成長能力が欠如している酵母の突然変異体菌株のための選択マーカーを提供する（Jones, Genetics, 85: 12 (1977)）。このとき、酵母宿主細胞ゲノム内のtrp1病変の存在は、トリプトファンの不在下での成長による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2-欠損酵母菌株（ATCC No. 20,622又は38,626）は、Leu2遺伝子を支持する既知のプラスミドによって相補される。

#### 【0123】

##### (iv) プロモータ構成要素

発現及びクローニングベクターは通常、宿主生体により認識され抗体核酸に対し作動的にリンクされるプロモータを含有する。プロモータは、それらが作動的にリンクされている抗体核酸配列といったような特定の核酸配列の転写及び翻訳を制御する構造遺伝子の開始コドンに対し上流（5'）にある未翻訳配列である。かかるプロモータは標準的に、誘発性と構成性という2つのクラスに入る。誘発性プロモータは、培養条件の幾分かの変更、例えば栄養分の存在又は不在又は温度変化などに応じてその制御下でDNAからの増大したレベルの転写を開始させるプロモータである。現時点で、さまざまな潜在的宿主細胞により認識された多数のプロモータが周知である。これらのプロモータは、制限酵素消化によりソ

ースDNAからプロモータを除去し分離したプロモータ配列をベクター内に挿入することによって、抗体をコードするDNAに作動的にリンクされる。抗体DNAの増幅及び／又は発現を導くためには、未変性抗体プロモータ配列及び数多くの非相同性プロモータの両方を使用することができる。しかしながら、未変性プロモータに比べ発現される抗体のより大きな転写及びより高い収量を一般に可能にすることから、非相同プロモータが好まれる。

#### 【0124】

原核性宿主で使用するのに適したプロモータとしては、 $\beta$ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモータ系 (Chang et al. Nature, 275: 615 (1978); 及びGoeddel et al., Nature. 281: 544 (1979))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモータ系 (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980) 及びEP 36,776) 及びtacプロモータといったようなハイブリッドプロモータ (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)) が含まれる。しかしながら、その他の既知の細菌プロモータも適切である。それらのヌクレオチド配列はすでに公表されており、よって、要求されたあらゆる制限部位を供給するべくリンカー又はアダプタを使用して当業者は抗体をコードするDNAに対しそれらを連結することができるようになっている (Siebenlist et al., Cell, 20: 269 (1980))。細菌系内で使用するためのプロモータは同様に、抗体ポリペプチドをコードするDNAに作動的にリンクされたシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列をも含有することになる。

#### 【0125】

真核生物について形質転換配列が知られている。事実上すべての真核性遺伝子が、転写が開始された部位から上流に約25～30塩基のところにあるAT富有領域を有する。数多くの遺伝子の転写開始から上流70～80塩基のところに見い出されるもう1つの配列は、Xが任意のヌクレオチドでありうるCXCAAT領域である。大部分の真核性遺伝子の3末端にあるのは、コーディング配列の3末端にポリA尾部を付加するためのシグナルでありうるAATAAA配列である。これらの配列のすべてが、真核性発現ベクター内に適切に挿入される。

#### 【0126】

酵母宿主と共に使用するための適切なプロモータ配列の例としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) 又はその他のグリコール酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968) ; 及びHolland, Biochemistry, 17; 4900 (1978)) , 例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのためのプロモータが含まれる。

#### 【0127】

成長条件により制御される転写の付加的な利点をもつ誘発性プロモータであるその他の酵母プロモータは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に付随する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ及びマルトース及びガラクトースの利用を担当する酵素のためのプロモータ領域である。酵母発現において使用するための適切なベクター及びプロモータは更に、Hitzeman et al. のEP 73 657 Aに記述されている。同様に有利には、酵母プロモータと共に酵母エンハンサーも使用される。

#### 【0128】

哺乳動物宿主細胞内のベクターからの抗体転写は、例えば、かかるプロモータが宿主細胞系と相容性があることを条件として、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (1989年7月5日に公示されたUK 2, 211, 504号)、アデノウイルス (例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び最も好ましくはシミアンウイルス40 (SV40) といったウイルスのゲノムから、例えばアクチンプロモータ又は免疫グロブリンプロモータといった非相同哺乳動物プロモータから、熱ショックプロモータから、及び通常抗体配列と会合させられるプロモータから得られたプロモータによって制御されうる。

#### 【0129】

SV40ウイルスの早期及び晩期プロモータは、同様にSV40ウイルス複製起点を含むSV40制限フラグメントとして適切に得られる。Fiers et al., Nature, 273:113 (1978); Mulligan 及び Berg Science, 209: 1422-1427 (1980); Pavlakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7398-7402 (1981)。ヒトサイトメガロウイルスの即時型早期プロモータは、Hind III E制限フラグメントとして適切に得られる。Greenaway et al., Gene, 18: 355-360 (1982)。哺乳動物宿主内でベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いてDNAを発現させるための系については、米国特許第4, 419, 446号で開示されている。この系の修正は、米国特許第4601978号に記述されている。同じく、サル細胞中の免疫インタフェロンをコードするcDNAの発現についてのGray et al., Nature, 295: 503-508 (1982); 単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモータの制御下でのマウスの細胞内のヒト $\beta$ -インタフェロンcDNAの発現についてのReyes et al., Nature, 297: 598-601 (1982); 培養したマウス及びウサギの細胞内でのヒトインタフェロン $\beta$ 1遺伝子の発現についてのCanaani及びBerg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 5166-5170 (1982); 及びラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモータとして用いた、CV-1サル腎細胞、ニワトリ胚芽線維芽細胞、チャイニーズハムスタ卵巢細胞、HeLa細胞及びマウスNIH-3T3細胞内での細菌CAT配列の発現についてのGorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6777-6781 (1982)も参照のこと。

#### 【0130】

##### (v) エンハンサー要素の構成要素

高等真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、往々にして、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することによって増大させられる。エンハンサーは、その転写を増大させるべくプロモータに作用する通常約10～300 bpのDNAのシス作用性要素である。エンハンサーは、イントロン (Banerji et al., Cell, 33: 729 (1983)) 内ならびにコーディング配列自体 (Osborne et al., Mol. Cell Bio., 4: 1293 (1984)) の中で、転写単位に対し5 (Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 993 (1981)) 及び3 (Lusky et al., Mol. Cell Bio., 3: 1108 (1983)) のところに発見された、比較的方向性及び位

置に依存したものである。現在、哺乳動物遺伝子から数多くのエンハンサー配列が知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、アフエトプロテイン及びインシュリン）。しかしながら、標準的には、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用されることになる。例としては、複製起点の晩期側のSV40エンハンサー（bp100～270）、サイトメガロウイルス早期プロモータエンハンサー、複製起点の晩期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーがある。真核性プロモータの活性化のためのエンハンサー要素についてのYaniv, Nature, 297: 17-18 (1982)も参照のこと。

エンハンサーは、抗体コード化配列に対し5又は3の位置でベクターにスプライシングされるが、好ましくは、プロモータから5の部位に位置設定される。

#### 【0131】

##### (vi) 転写終結構成要素

真核性宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、人間又はその他の多細胞生体からの有核細胞）内で使用される発現ベクターは同様に転写の終結及びmRNAの安定化のために必要な配列をも含むことになる。かかる配列は、真核性又はウイルスDNA又はcDNAの5及び場合によっては3の未翻訳領域から一般に入手できるものである。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの未翻訳領域内にポリアデニル化されたフラグメントとして転写されたヌクレオチドセグメントを含む。

#### 【0132】

##### (vii) ベクターの構築及び分析

以上で列挙した1つ以上の構成要素を含む適切なベクターの構築には、標準的な連結技術が利用される。分離されたプラスミド又はDNAフラグメントが切断され、目的に合わせて調整され、必要とされるプラスミドを生成するのに望ましい形へと再度連結される。

#### 【0133】

構築されたプラスミド内の正しい配列を確認するための分析用には、E. coli K12菌株294（ATCC No. 31446）を形質転換するべく連結混合物が使用され、該当する場合、アンピシリン又はテトラサイクリン耐性によって形

質転換に成功した形質転換体が選択される。形質転換体からのプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析され、かつ／又はMessing et al., Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981)の方法によって、又はMaxam et al., Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)の方法によって配列決定される。

#### 【0134】

##### (viii) 過渡的発現ベクター

本発明の実施において特に有用であるのは、抗体ポリペプチドをコードするDNAの哺乳動物細胞内での過渡的な発現を提供する発現ベクターである。一般に、過渡的発現には、宿主細胞が発現ベクターの数多くのコピーを蓄積し、代りに発現ベクターによりコードされる望ましいポリペプチドを高レベルで合成するような形で、宿主細胞内で効率良く複製できる発現ベクターを使用することが関与している。Sambrook et al., supra. pp. 16.17-16.22。適切な発現ベクター及び宿主細胞を含む過渡的発現系は、クローン化されたDNAによりコードされるポリペプチドの簡便で明確な同定ならびに望まれる生物学的又は生理学的特性についてのかかるポリペプチドの迅速なスクリーニングを可能にする。かくして、過渡的発現系は、抗体ポリペプチドの生物学的活性をもつ抗体ポリペプチドの類似体及び変異体を同定することを目的として、本発明において特に有用である。

#### 【0135】

##### (ix) 適当な脊椎動物細胞ベクター例

組換え型脊椎動物培養細胞内における抗体の合成に適合させるのに適したその他の方法、ベクター及び宿主細胞がGething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281: 40-46 (1979); Levinson et al.: EP 117, 060; 及びEP 117, 058に記述されている。哺乳動物細胞培養発現のための特に有用なプラスミドは、pRKS (EP 307, 247 米国特許no. 5, 258, 287) 又はpSV16B (PCT特許公報No. WO 91/08291) である。

#### 【0136】

本発明中のベクターをクローニング又は発現するための適切な宿主細胞は、原核生物、酵母又は上述の高等真核細胞である。適切な原核生物としては、ユウバ

クテリウム、例えばグラム陰性又はグラム陽性生体例えば *E. coli*, *B. Subtilis* といった *Bacilli*, *P. aeruginosa* といった *Pseudomonas* 種、*Salmonella typhimurium* 又は *Serratia Marcescans*. が含まれる。1つの好ましい *E. coli* クローニング宿主は、*E. coli* 294 (ATCC No. 31, 446) であるが例えば *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC No. 31, 537) 及び *E. coli* W3110 (ATCC No. 27, 325) といったその他の菌種も適している。これらの例は、制限的意味のあるものではなく、単なる一例である。好ましくは、宿主細胞は最少量のタンパク質分解酵素を分泌すべきである。代替的には、例えば PCR 又はその他の核酸ポリメラーゼ反応といったクローニングの *in vitro* での方法も適している。

#### 【0137】

原核生物に加えて、糸状真菌や酵母といったような真核微生物も、抗体コード化ベクターのための適切な宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* 又は一般的なパン酵母は、下等真核性宿主微生物の中で最も一般的に用いられている。しかしながら、その他の数多くの属、種及び菌株、例えば、*Schizosaccharomyces pombe* (Beach 及び Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981): 1985 年 5 月 2 日公示の EP 139, 383)。 *Kluyveromyces hosts* (米国特許 No. 4, 943, 529) 例えば、*K. lactis* (Louvencourn et al. *J. Bacteriol.*, 737 (1983))。 *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans*. 及び *K. marxianus*. *Yarrowia* (EP40 2,226), *Pichia pastoris* (EP 183,070; Steekrishna et al., *J. Basic Microbiol.* 28: 265-278 (1988))。 *Candida Trichoderma reesia* (EP244,234), *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 (1979))。 及び糸状真菌例えば、*Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, 1991 年 1 月 10 日公示)。 及び *Aspergillus* 宿主、例えば、*A. nidulans* (Ballance et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 (1983); Tilburn et al., *Gene* 26: 205-221 (1983); Yelton et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 (1984)) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 (1985)) も一般に入手可能であり、ここでは有用である。

#### 【0138】

グリコシル化された抗体の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生体から誘導される。かかる宿主細胞は、複合体プロセッシング及びグリコシル化活動を行うことができる。原則として、いずれの高等真核細胞培養も、脊椎動物又は無脊椎動物のいずれの培養体からのものであろうと機能しうる。数多くのバキュロウイルス菌株及び変異体及び*Spodoptera frugiperdra* (毛虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ミバエ) 及び*Bombyx mori* といった宿主からの対応する許容しうる昆虫宿主細胞が同定された。例えば Luckow et al. *Bio/Technology*. 6: 47-55 (1988); Miller et al, *Genetic Engineering*, setlow et al. eds., 第8巻 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; 及び Maeda et al., *Nature*, 315: 592-594 (1985) を参照のこと。例えば *Autographa californica* NPV の L-1 変異体及び *Bombyx mori* NPV の Bm-5 菌株といったトランスフェクション用のさまざまなウイルス菌株が公に入手可能であり、かかるウイルスは、本発明に従って本書中のウイルスとして、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために使用することができる。

#### 【0139】

宿主として、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコの植物細胞培養を利用することができる。標準的には、植物細胞は、抗体DNAを含有するべくあらかじめ操作された細菌 *Agrobacterium tumefaciens* のある種の菌株とのインキュベーションによってトランスフェクションされる。*A. tumefaciens* を用いた植物細胞培養のインキュベーションの間、抗体をコードするDNAは、それがトランスフェクションを受け適切な条件下で抗体DNAを発現することになるように、植物細胞宿主へと転移される。更に、植物細胞と相容性がある例えばノパリンシンターゼプロモータ及びポリアデニル化シグナル配列といったような調節及びシグナル配列も利用可能である。Depicker et al., *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 561 (1982)。更に、T-DNA 780 遺伝子の上流領域から分離されたDNAセグメントは、組換え型DNA含有植物組織内の植物発現可能遺伝子を活性化するか又はその転写レベルを増大させる能力をもつ。1989年6月21日公示のEP 321, 196。



#### 【0140】

しかしながら、最も興味深いのは脊椎動物の細胞内においてであり、培養（組織培養）中の脊椎動物の細胞の増殖は、近年では日常的な手順となっている（Tissue Culture. Academic Press, Kruse Patterson, editors. (1973)）。有用な哺乳動物宿主細胞系統の例としては、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系統（COS-7, ATCC CRL165）；ヒト胚芽腎細胞系統（懸濁培養中での成長のためにサブクローニングされた293又は293細胞Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)）；ハムスター乳児腎細胞（BHK, ATCC CCL10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR（CHO, Urlaub and Chasin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)）；サル腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカサバンナモンキー腎細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸ガン細胞（HELA, ATCC CCL2）；イヌ腎細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；バッファローラット肝細胞（BRL3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL75）；ヒト肝細胞（HepG2, HB8065）；マウス乳ガン（MMT 060562, ATCC CCL51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)）；MRC5細胞；FS4細胞；及びヒト肝ガン系統（Hep G2）がある。

#### 【0141】

宿主細胞は、本発明の上述の発現ベクター又はクローニングベクターでトランスフェクションされ好ましくは形質転換され、プロモータを誘導し形質転換体を選択し又は望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修正された従来の栄養培地の中で培養される。

#### 【0142】

トランスフェクションというのは、何らかのコーディング配列が実際に発現されたか否かとは無関係に宿主細胞により発現ベクターが取込まれることを言う。当業者に知られている、トランスフェクションの方法は数多くあるが、例としてはCaPO<sub>4</sub>及び電気穿孔法が挙げられる。このベクターの作用の何らかの兆候

が宿主細胞で現われたときに、一般にトランスフェクションが認識される。

#### 【0143】

形質転換というのは、染色体外要素としてか又は染色体の不可欠成分によってDNAが複製可能となるように、生体内にDNAを導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、かかる細胞に適した標準的技術を用いて行われる。Sambrook et al., 前出の第1, 82節で記述されているような塩化カルシウムを利用したカルシウム処理は、実質的な細胞壁バリアを含む原核生物又はその他の細胞のために使用される。Shaw et al., Gene, 23: 315 (1983)及び1989年6月29日に公示されたWO89/05859により記述されているように、ある種の植物細胞の形質転換のためには、*Agrobacterium runefaciens*での感染が使用される。更に、1991年1月10日に公示されたWO91/00358に記述されているとおりに、超音波処理を用いて植物をトランスフェクションすることもできる。このような細胞壁の無い哺乳動物細胞については、Graham及びvan der Eb. Virology. 52: 456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈殿法が好まれる。哺乳動物細胞宿主系形質転換の全体的様相は、1983年8月16日付の米国特許No. 4, 399, 216の中でAxelによって記述されてきた。酵母内への形質転換は標準的には、van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、核注入、電気穿孔法又はプロトプラスト融合などによる細胞内へのDNAの導入のためのその他の方法も同様に使用可能である。

#### 【0144】

本発明の抗体ポリペプチドを産生するのに用いられる原核細胞は、Sambrook et al., 前出で一般的に記述されているように、適切な培地内で培養される。

#### 【0145】

本発明の抗体を産生するのに使用される哺乳動物宿主細胞は、さまざまな培地内で培養されうる。Ham's F10 (Sigma), 最少必須培地 (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 及びダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM), (Sigma) といった市販の培地が、宿主細胞の培養に適している。

更にそのすべての開示が本書に参考として内含されるHam and Wallace, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes and Sato, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), 米国特許No. 4, 767, 704; 4, 657, 866; 4, 927, 762; 又は4, 560, 655; WO90/03430; WO87/00195: 又は米国特許Re. 30, 985; 内に記述されている培地のいずれかも、宿主細胞のための培地として使用可能である。これらの培地のうちのいずれも必要に応じて、ホルモン及び／又はその他の成長ホルモン（例えばインシュリン、トランスフェリン又は表皮細胞成長因子）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩）、緩衝液（例えばHEPES）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えばGentamycin<sup>TM</sup>薬物）、微量元素（マイクロモル範囲内の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義されるもの）及びグルコース又は同等のエネルギー源で補足されうる。当業者にとっては既知のものであるその他のあらゆる必要な補充物質を適切な濃度で含み入れることも可能である。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞について以前に使用されたものであり、当業者にとっては明白であろう。

#### 【0146】

この開示中で言及されている宿主細胞は、in vitro培養内の細胞ならびに宿主動物内にある細胞を包含する。

#### 【0147】

遺伝子の増幅及び／又は発現は、例えば本書に提供されている配列に基づき、適切に標識づけされたプローブを用いて、インサイチュハイブリダイゼーションによって、又は従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロット法（Thomas Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5201-5202 (1980)）、ドットブロット法（DNA分析）によって直接、標本内で測定されうる。さまざまな標識を利用することができるが、最も一般的には放射性同位元素、特に<sup>32</sup>Pである。しかしながら、ポリヌクレオチド内への導入のためビオチンで修飾されたヌクレオチドを使用することといったその他の技術も同様に利用可能である。このときビオチンは、放射性核種、蛍光剤、酵素などといった多様な標識で標識可能である、アビジン又は抗体に対する結合のための部位として役立つ。代替

的には、DNA重複分子、RNA重複分子及びDNA-RNAハイブリッド重複分子又はDNA-タンパク質重複分子を含む特異的重複分子を認識できる抗体を利用することができる。一方、抗体は標識づけを受けることができ、表面上に重複分子が結合した時点で重複分子に結合させられた抗体の存在を検出することができるように、重複分子が表面に結合させられる検定を実施することが可能である。

#### 【0148】

代替的には、遺伝子発現は、遺伝子産物の発現を直接定量するべく、組織切片の免疫組織化学染色及び細胞培養又は体液の検定といったような免疫学的方法によって測定可能である。免疫組織化学染色技術によると、細胞標本は、標準的には脱水及び固定、そしてそれに続く、カップリングされた遺伝子産物に特異的な標識づけされた抗体との反応によって調製され、ここで標識は、酵素標識、蛍光標識、発光標識などといったように、通常視覚的に検出可能である。本発明で使用するのに適した特に感受性の高い染色技術は、Hsu et al., Am. J. Clin. Path., 75: 734-738 (1980). によって記述されている。

#### 【0149】

抗体は好ましくは、培地から分泌ポリペプチドとして回収されるが、分泌シグナル無しで直接発現された場合、宿主細胞溶解物から回収することもできる。

#### 【0150】

抗体がヒト由来のもの以外の組換え型細胞の中で発現されている場合、その抗体は、ヒト由来のタンパク質又はポリペプチドを全く含まない。しかしながら、それでも通常は、m p l リガンド自体に関して実質的に均質である調製物を得るためその他の細胞タンパク質又はポリペプチドから抗体を精製することが必要である。第1の段階として、培地又は細胞溶解物は、粒状細胞デブリを除去するべく、遠心分離に付される。そのとき、膜及び可溶性タンパク質分画が分離される。代替的には、市販のタンパク質濃縮フィルタ（例えば、AMICON又はMillipore PELICON限外ろ過ユニット）を使用することができる。このとき、抗体は可溶性タンパク質分画から精製できる。その後、抗体は、汚染性の可溶性タンパク質及びポリペプチドから、塩析及び交換又はさまざまなゲ

ル基質を用いたクロマトグラフィ手順によって精製される。これらの基質としては、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース及びその他のタンパク質精製に一般的な基質が含まれる。タンパク質精製のために適したクロマトグラフィ手順の例としては、イムノアフィニティ、受容体アフィニティ（例えば m p l - I g G 又はプロテイン A セファロース）、疎水的相互作用クロマトグラフィ（H I C）（例えばエーテル、ブチル又はフェニル Toyopearl）、レクチンクロマトグラフィ（例えば C o n A - セファロース、レンチルーレクチン - セファロース）、サイズ排除（例えば S E P H A D E X G - 7 5）、カチオン及びアニオン交換カラム（例えば、D E A E 又はカルボキシメチル及びスルフォプロピル - セルロース）及び逆相高速液体クロマトグラフィ（R P - H P L C）（例えば 2 つの逐次的 R P - H P L C 段階が組換え型 ヒト I L - 2 の精製のために用いられる。Urdal et al. J. Chromatog., 296: 171 (1984) を参照のこと）が含まれる。その他の精製段階には、場合により、エタノール沈殿、硫酸ナトリウム沈殿；クロマトフォーカシング；予備的 SDS - P A G E などが含まれる。

#### 【0151】

残基が欠失、挿入又は置換された抗体変異体は、変異により引き起こされた物性の何らかの実質的な変化を考慮に入れて、同じ要領で回収される。例えば、もう 1 つのタンパク質又はポリペプチド例えば細菌又はウイルス抗原との抗体融合の調製は、精製を容易にする。融合ポリペプチドを吸着させるために、抗原に対する抗体を含むイムノアフィニティカラムを使用することができる。ウサギポリクローナル抗体カラムといったようなイムノアフィニティカラムを用いて、少なくとも 1 つの残留免疫エпитープに抗体変異体を結合させることによりこれを吸収することが可能である。代替的には、当該技術分野においては周知の手段により、A F F I - G e l 1 0 (Bio-Rad, Richmond, CA) などといった（好ましくは）固定化された樹脂に固着された精製受容体 - I g G を用いて、アフィニティクロマトグラフィにより抗体を精製することができる。フェニルメチルスルフォニルフルオリド（P M S F）といったプロテアーゼ阻害物質も又、精製中のタンパク質分解劣化を阻害するのに有用であり得、付随的な汚染物質の成長を妨げるため抗生物質を内含させることもできる。当業者であれば、未変性抗体に適した

精製には、組換え型細胞培養内での発現時点での抗体又はその変異体の特性の変化を考慮に入れるため修正が必要となるかもしれないということを認めるだろう。

#### 【0152】

本発明の最も好ましい実施形態においては、抗体はアゴニスト抗体 (aAb) である。「アゴニスト抗体」というのは、特定の造血性成長因子受容体に結合しこれを活性化させることのできる抗体のことである。例えば、アゴニストは、受容体の細胞外ドメインに結合しかくして半固体培養中の巨核球コロニー及び液体懸濁培養中の単一の巨核球の分化及び増殖及びin vitro及び/又はin vivoでの血小板産生をひき起こすことができる。アゴニスト抗体は好ましくは、受容体の細胞外ドメイン内のエピトープに対するものである。したがって抗体は、好ましくは、本書に特定の開示されている12E10、12B5、10F6及び12D5のモノクローナル抗体と実質的に同じエピトープに結合する。最も好ましくは抗体は同様に、本書に開示されているモノクローナル抗体と実質的に同じ又はそれ以上の抗原結合親和力を有することになる。モノクローナル抗体が、特定の開示されている抗体と同じ特異性をもつか否かを見極めるためには、例えば、競合ELISA結合検定を用いることができる。

#### 【0153】

本発明の方法において有用であるモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、ヒト抗体のH及びL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力をもつオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）容易に分離され配列決定される。本発明のファージは、かかるDNAの好ましい供給源として役立つ。ひとたび分離されたDNAは、発現ベクター内に入ることができ、これらのベクターは次に、組換え型宿主細胞内のモノクローナル抗体の合成を得るべく、その他の形では免疫グロブリンタンパク質を産生しないE. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞又は骨髓腫細胞といった宿主細胞内にトランスフェクションされる。

#### 【0154】

#### IV. 利用

本明細書に開示された抗体は、目的の受容体を活性化するためのin vitro診断アッセイにとって有用である。これは、巨核球の増殖及び／又は分化並びに血小板の生成における受容体の役割を研究するために有用である。

#### 【0155】

造血細胞の増殖、分化もしくは成熟及び／又はアポトーシスの調節（刺激又は阻害のいずれか）を刺激することができる、生物学的活性を有するc-mplアゴニスト抗体は、血小板の生成の障害、枯渇、又は破壊の増加による血小板減少症に罹患した患者において、巨核球生成又は血小板生成の活性を刺激するための無菌の薬学的調製物又は製剤において使用されうる。血小板減少症に関連した骨髓形成不全（例えば、化学療法又は骨髓移植の後の再生不良性貧血）、更には汎発性血管内凝固症候群（DIC）、免疫性血小板減少症（HIV誘導型ITP及び非HIV誘導型ITP）、慢性特発性血小板減少症、先天性血小板減少症、骨髓形成異常、及び血栓性血小板減少症が、本発明のaAb化合物を用いて効果的に治療されうる。

#### 【0156】

巨核球生成又は血小板生成の生物学的活性を有する本発明のc-mplアゴニスト抗体の好ましい用途は、白血病又は固形腫瘍の治療のための骨髓毒性化学療法、自己又は同種異系の骨髓移植のための骨髓切除化学療法、骨髓形成異常、特発性再生不良性貧血、先天性血小板減少症、及び免疫性血小板減少症である。

#### 【0157】

生物学的活性を有する本発明のc-mplアゴニスト抗体は、上述の疾患及び状態の治療において、単独で、又は他のサイトカイン、ヘマトポエチン、インターロイキン、増殖因子もしくは抗体と組み合わせて使用されうる。したがって、本化合物は、G-CSF、GM-CSF、LIF、M-CSF、IL-1、IL-3、エリスロポエチン（EPO）、キット・リガンド、IL-6、及びIL-11を含む造血活性を有する他のタンパク質又はペプチドと組み合わせて使用されうる。

#### 【0158】

生物学的活性を有する本発明のc-mplアゴニスト抗体は、トロンボポエチ

ン(TPO)と同じ方法で、同じ適応症に使用されうる。aAbのいくつかの型は、天然TPO又はPEG化TPOよりも長い半減期を有しており、よってより長い半減期が必要とされる適応症において使用される。

**【0159】**

インビボ投与に用いられる場合、抗体製剤は無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再生の前又は後に、無菌濾過膜で濾過することにより容易に達成される。抗体は、通常、凍結乾燥型又は溶液で保存される。

**【0160】**

治療用抗体組成物は、一般的に、無菌の出入口を有する容器、例えば皮下注射針により貫通されうるストッパーを有する静脈用溶液バッグ又はバイアルに投入される。

**【0161】**

抗体投与の経路は、例えば、静脈経路、腹腔内経路、大脳内経路、筋肉内経路、眼内経路、動脈内経路、包膜内経路、吸入もしくは病巣内経路、又は下記の持続型放出系による注射又は注入などの既知の方法と調和している。抗体は、好ましくは、注入により継続的に、又はボーラス注射により投与される。

**【0162】**

治療に使用される抗体の有効量は、例えば、治療対象、投与の経路、及び患者の状態により異なるであろう。したがって、治療者は、最適な治療効果を得るために必要とされる用量の滴定及び投与経路の修飾を行う必要がある。典型的には、臨床医は、用量が所望の効果を達成するに至るまで抗体を投与するであろう。この療法の進行は、従来のアッセイにより容易にモニターされる。

**【0163】**

本発明の抗体は、薬学的に許容される担体と混合して調製されうる。この治療用組成物は、好ましくは液体又は粉末エアロゾル(凍結乾燥物)として、静脈内に、又は鼻もしくは肺を介して投与されうる。組成物は、所望により、非経口投与により、又は皮下に投与されてもよい。全身投与される場合には、治療用組成物は、無菌で、発熱性物質を含まず、かつ妥当なpH、等張性、及び安定性の値を有する非経口的に許容される溶液である必要がある。これらの条件は、当業者に



既知である。簡単に述べると、本発明の化合物の用量製剤は、所望の純度を有する化合物を生理学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤と混合することにより保存又は投与のため調製される。そのような材料は、使用される用量及び濃度において受容者に対して非毒性であり、TRIS HCl、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩及びその他の有機酸塩のような緩衝液；アスコルビン酸のような抗酸化剤；ポリアルギニンのような低分子量（約10残基未満）ペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリジノンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、又はアルギニンのようなアミノ酸；セルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及びその他の炭水化物；EDTAのようなキレート化剤；マンニトール又はソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような対イオン並びに／又はTWEEN、PLURONICSもしくはポリエチレングリコールのような非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0164】

注射用無菌組成物は、従来の薬学的慣習によって製剤化されうる。例えば、水又はゴマ油、ピーナッツ油、もしくは綿実油などの天然に存在する植物油又はオレイン酸エチルなどの合成脂肪族媒体のような媒体中の活性化合物の溶液又は懸濁液が望ましいかもしれない。緩衝液、保存料、抗酸化剤などは、許容された薬学的慣習に従い取り込まれうる。

#### 【0165】

持続放出型調製物の適当な例は、例えばフィルム又はマイクロカプセルなどの成形品の型の、ポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含む。持続放出型マトリックスの例には、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、Langerら., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)により記載されたようなポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3, 773, 919号、欧州特許第58, 481号）、L-グルタミン酸とガンマ-エチルーL-グルタメートとの共重合体（Sidmanら., Biopolymer, 22: 547-556 (1983)）、非分解性エチレン-酢酸ビニル（Langerら、前記）、LUPRON De

pot (登録商標) (乳酸-グリコール酸共重合体とロイプロリド・アセテートとからなる注射可能マイクロスフェア) のような分解性乳酸-グリコール酸共重合体、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (欧州特許第 1 3 3, 9 8 8 号) が含まれる。

#### 【0166】

エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸のような重合体は、100日間を越える分子の放出を可能にするが、ある種のハイドロゲルは比較的短い時間にわたりタンパク質を放出する。カプセル化タンパク質は、体内に長時間残留する場合、37℃で水分に曝露される結果として変性又は凝集し、結果として生物学的活性の消失及びおそらくは免疫原性の変化が起こる可能性がある。合理的な戦略は、関与するメカニズムに応じてタンパク質安定化のため工夫されうる。例えば、凝集メカニズムがジスルフィド交換を介した分子内S-S結合形成であることが発見された場合には、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の制御、適当な添加剤の使用、及び特別な重合体マトリックス組成物の開発により達成されうる。

#### 【0167】

持続放出版組成物には、リポソームに捕捉されたTPOも含まれる。TPOを含むリポソームは、既知の方法：ドイツ特許第3, 218, 121号；Epsteinら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985)；Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980)；欧州特許第52, 322号；欧州特許第36, 676号；欧州特許第88, 046号；欧州特許第143, 949号；欧州特許第142, 641号；日本特許出願第83-118008号；米国特許第4, 485, 045号及び第4, 544, 545号；並びに欧州特許第102, 324号により調製される。通常、リポソームは、液体含量が約30モル%コレステロールより大きく、選択された割合が最適な療法のために調整される、小型 (約200~800 Å) の単層型である。

#### 【0168】

抗体の用量は、疾患の重症度及び型、体重、性別、食事、投与の時間及び経路、他の薬剤及び他の関連する臨床的要因を含む、薬物の作用を修飾することが知

られている様々な要因を考慮して、治療する医師により決定されるであろう。治療に有効な用量は、in vitro又はin vivoのいずれかにより決定されうる。

#### 【0169】

治療に使用されるアゴニスト抗体の有効量は、例えば、治療対象、投与の経路、及び患者の状態により異なる。したがって、治療者は、最適な治療効果を得るために必要とされる用量の滴定及び投与経路の修飾を行う必要があるであろう。典型的な1日用量は、上記の要因に応じて、約1  $\mu$ g/kg～最大1,000mg/kg又はそれ以上までの範囲でありうる。典型的には、医師は、用量が所望の効果を達成するに至るまで分子を投与するであろう。この療法の進行は、従来のアッセイにより容易にモニターされうる。

#### 【0170】

例えば、一つ又は複数の別々の投与によるのであっても、継続的な注入によるのであっても、疾患の型及び重症度に応じて、約0.001mg/kg～約1000mg/kg、より好ましくは約0.01mg/kg～約100mg/kg、より好ましくは約0.010mg/kg～約20mg/kgのアゴニスト抗体が、患者への投与のための最初の候補用量でありうる。状態に応じて数日又はそれ以上にわたる反復投与のため、所望の疾患の症状の抑制が起こるまで、又は患者の状態の所望の改善が達成されるまで、治療は繰り返される。しかし、他の用量計画も有用であるかもしれない。

#### 【0171】

##### 実施例

当業者は、更なる説明なしに、前記の説明及び例示的な実施例を用いて、本発明を最も十分な範囲まで作製及び利用することができると考えられる。したがって、以下の作業実施例は、本発明の好ましい実施態様を具体的に指摘しており、決して開示の残部を制限するものと解釈されるべきではない。

#### 【0172】

##### 実施例1

##### アッセイ

mp1アゴニスト抗体アッセイは、本質的にはWO95/18858に記載のように行われた。

### 【0173】

#### (a) Ba/F3細胞増殖アッセイ

全長mpl受容体をコードするcDNAをIL-3依存性ネズミ・リンパ芽球細胞系Ba/F3へ導入することにより、Ba/F3-mpl細胞系を樹立した(F. de Sauvageら, Nature, 369: 533 (1994))。様々な濃度の抗体又はTPOに反応したBa/F3-mpl細胞の増殖の刺激を、以前に記載されたようにして、<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量によって測定した(F. de Sauvageら, 前記)。

### 【0174】

#### (b) 血小板抗原GPIIb/IIIa発現の誘導のためのCMKアッセイ

CMK細胞を、10%胎児ウシ血清及び10mMグルタミンが補足されたRPMI 1640培地(シグマ(Sigma))で維持した。アッセイの準備において、細胞を収集し、洗浄し、5mg/lウシ・インシュリン、10mg/lアポ・トランスフェリン、1×微量元素が補足された無血清GIF培地へ $5 \times 10^5$ 個/mlで再懸濁させた。96穴平底プレートにおいて、TPO標品又は実験的アゴニスト抗体試料を適当な希釈率で100mlの容量で各ウェルに添加した。100mlのCMK細胞懸濁液を各ウェルに添加し、プレートを5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で48時間37℃でインキュベートした。インキュベーション後、プレートを1000rpmで4℃で5分間スピンのした。上清を捨て、100mlのFITC結合GPIIb/IIIaモノクローナル2D2抗体を各ウェルに添加した。4℃で1時間のインキュベーションの後、再び1,000rpmで5分間プレートをスピンのした。未結合抗体を含む上清を捨て、200mlの0.1%BSA-PBS洗浄を各ウェルに添加した。0.1%BSA-PBS洗浄工程を3回反復した。その後、相対蛍光強度を測定する標準的な1パラメータ解析を用いてFASCANで細胞を分析した。

### 【0175】

#### (c) mpl-Rse. gDキメラ受容体のリン酸化の測定のためのKIRAE LISA

ヒトmpl受容体は、Vigonら, PNAS, USA 89: 5640-5644 (1992)により開示されている。mpl受容体の細胞外ドメイン(ECD)と、カルボキシル末端flagポリペプチドを含むRse(Markら, J. of Biol. Chem. 269 (14): 1072

0-10728 (1994)) の膜貫通及び細胞内ドメイン (ICD) (即ち, R s e. g D) とを含むキメラ受容体を、本明細書に記載の K I R A E L I S A における使用のため作成した。

【0176】

(i) 捕捉剤調製

ヘルペス単純ウイルス糖タンパク質 D (Paborsky ら, Protein Engineering 3 (6): 547-553 (1990)) 由来のペプチドに対してモノクローナル抗 g D (クローン 5 B 6) を作製した。精製されたストック調製物を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、pH 7. 4 中 3. 0 mg/ml に調整し、1. 0 ml に等分したものを -20℃ で保存した。

【0177】

(ii) 抗ホスホチロシン抗体調製

モノクローナル抗ホスホチロシン、クローン 4 G 1 0 を、U B I (レーク・プラシド (Lake Placid)、NY) から購入し、長腕ビオチン-N-ヒドロキスチンアミド (Biotin-X-NHS、リサーチ・オーガニックス (Research Organics)、クリーブランド (Cleveland)、OH) を用いてビオチン化した。

【0178】

(iii) リガンド

m p l リガンドを、本明細書に記載の組み換え技術により調製した。精製された m p l リガンドをストック溶液として 4℃ で保存した。

【0179】

本発明のアゴニスト抗体に関する K I R A E L I S A の結果を図 9 に示す。このアッセイは、本発明の抗体がコグネートリガンド T P O と類似の程度で m p l 受容体を活性化することを示している。

【0180】

(d) T P O 受容体結合阻害アッセイ

N U N C 9 6 穴 イムノプレート を、2 μ g/ml のウサギ抗ヒト I g G F c (ジャクソン・ラブズ (Jackson Labs)) を含む炭酸緩衝液 (pH 9. 6) 50 μ l で 4℃ で一晚コーティングした。E L I S A 緩衝液 (P B S、1% B S A、0. 2

%TWEEN 20) によるブロッキングの後、プレートをm p l - l g 形質転換 293細胞由来の調整培地と共に2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、2.5 ng/ml でビオチン化した。様々な濃度の抗体の存在化又は非存在化でTPOを添加した。1時間のインキュベーション及び洗浄の後、ストレプトアビジン-HRP (シグマ) と共に、次にTMBペルオキシダーゼ基質 (キルケガード・アンド・ペリー (Kirkegaard & Perry)) と共にインキュベーションすることにより、結合したTPOの量を検出した。すべての希釈をELISA緩衝液中で行い、すべてのインキュベーションを室温で行った。発色を $H_3PO_4$ で停止させ、吸光度を450~650nmで読み取った。

#### 【0181】

##### (e) HU-03細胞増殖アッセイ

HU-01細胞系 (D.Morgan、ハーネマン大学 (Hahnemann University)) は、急性巨核芽球性白血病患者に由来し、増殖のため顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) に依存している。ここで用いられたHU-03細胞系は、GM-CSFではなくrhTPOにおける増殖への適合により、HU-01細胞に由来するものであった。

#### 【0182】

2%熱不活化ヒト男性血清及び5 ng/ml rhTPOが補足されたRPMI 1640中で、HU-03細胞を維持した。アッセイの前に、TPOを除去し、血清濃度を1%に減少させ、細胞濃度を $2.5 \times 10^5$ 個/mlに調整した後、16時間のインキュベーションを行うことにより、細胞を飢餓状態にさせた。その後、細胞を洗浄し、様々な濃度のTPO又は抗体を含む培地中、1ウェル当たり $5 \times 10^4$ 個の密度で96穴プレートに植え付けた。4連アッセイを行った。1  $\mu$ Ci の $^3H$ -チミジン各ウェルに添加した後、24時間のインキュベーションを行った。細胞をパッカード (Packard) 細胞収集器を用いて回収し、 $^3H$ -チミジンの取り込みをトップ・カウント・カウンター (Top Count Counter) (パッカード) を用いて測定した。

#### 【0183】

##### (f) 液体懸濁液巨核球生成アッセイ

以前に記載された液体懸濁液アッセイ (Grantら, Blood 69: 1334-1339 (1997)) の変法を用いて、ヒト巨核球生成に対するMpl アゴニスト抗体の効果を求めた。ヒト臍帯血から軟膜を回収し、120gで15分間室温で遠心分離することによりリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄し、血小板を多く含む血漿を除去した。細胞ペレットをイスコブ (Iscove's) 改変ダルベッコ (Dulbecco's) 培地 (IMDM、ギブコ (GIBCO)) (1ml当たり100単位のペニシリン及びストレプトマイシンを補足) に再懸濁させ、60%パーコール (密度=1.077gm/ml、ファルマシア (Pharmacia)) に重層し、800gで20分間室温で遠心分離した。低密度単核細胞を界面から回収し、IMDMで2回洗浄した。30%胎児ウシ血清 (FBS)、1ml当たり100ユニットのペニシリン及びストレプトマイシン、並びに20 $\mu$ Mの2-メルカプトエタノールが補足されたIMDM中、細胞を1ml当たり $1 \times 10^6$ 個で24穴組織培養プレート (COSTER) に植え付けた。トロンボポエチン (TPO) 又は抗体12B5もしくは抗体12D5のFab' 2型の段階希釈物を4連ウェルに添加した。対照ウェルには、付加的な補足物が含まれなかった。最終容量は1ウェル当たり1mlであった。培養物を、37℃で5%CO<sub>2</sub>中、14日間、加湿インキュベーター内で増殖させた。ヒト巨核球糖タンパク質IIb/IIIaに対して特異的であることが示されている (Grantら, 前記)、放射標識されたネズミ・モノクローナル抗体HP1-1D (W. L. Nichols, メイヨ・クリニック (Mayo Clinic) により提供) を用いて、巨核球生成を定量した。細胞を、組織培養プレートから収集し、アッセイ緩衝液 (20%FBS、0.002%EDTAを含むPBS) で2回洗浄し、20ngのヨウ化HP1-1D (およそ100,000cpm) を含む100 $\mu$ lのアッセイ緩衝液中に再懸濁させた。室温で1時間のインキュベーションの後、細胞をアッセイ緩衝液で2回洗浄し、細胞ペレットをガンマ・カウンターで計数した。

#### 【0184】

このアッセイにおいて用いられたFBSは、1mg/mlのデキストランT40及び10mg/mlの炭で30分間処理し、遠心分離し、デカントし、フィルター滅菌し、56℃で30分間熱不活化した。

#### 【0185】

(g) HU-03細胞及びヒト血小板に関するTPO-抗体競合結合アッセイ  
HU-03細胞を上記のようにして培養した。クエン酸が添加された全血を400gで5分間遠心分離することにより、血小板を多く含む血漿(RPR)を調製した。結合研究は、回収の3時間以内に行った。間接的ヨード化(Fielder, P. J., Hass, P., Nagel, M., Stefanich, E., Widmer, R., Bennett, G. L., Keller, G., de Savage, F. J., 及びEaton, D. 1997、トロンボポエチンの結合及び分解に関するモデルとしてのヒト血小板 (Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin)、Blood 89: 2782-2788)により<sup>125</sup>I-TPOを調製し、タンパク質1μg当たり15~50μCiという特異的活性を得た。

#### 【0186】

100pMヨウ化TPOを含む110マイクロリットルの容量で、 $2 \times 10^6$ 個の洗浄されたHU-03細胞を含むハンク平衡塩溶液、5mg/mlウシ血清アルブミン(HBSSB)又は $4 \times 10^7$ 個の血小板を含む血漿を、様々な濃度の抗体と共に、3連で、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション時間の間、懸濁状態を維持するため、HU-03細胞を攪拌した。反応混合物を1mlの20%ショ糖-HBSSBに重層し、13,500rpmで5分間微量遠心分離した。上清を吸引し、細胞ペレットを含むチューブの底部を切り取り、イソデータ・モデル(Iso Data Model)120ガンマ・カウンターを用いて、細胞又は血小板に関連した放射活性を測定した。

#### 【0187】

このアッセイにおけるいくつかの本発明のアゴニスト抗体に関する結果を、図10A~Fに示す。グラフ中の棒が長いほど、特定の濃度における結合した放射標識TPOの量が多く、アゴニスト抗体による競合が少ないことを示している。

#### 【0188】

##### (h) 親和性決定

BIACORE表面プラズモン共鳴系(ファルマシア・バイオセンサー(Pharmacia Biosensor))を用いて測定された会合及び解離の速度定数から、いくつかのFab断片の受容体結合親和性を計算した(Lofas & Johnson, 1990)。供



給者（ファルマシア・バイオセンサー）の指示に従いN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて、gD-mpl受容体の共有カップリングのため、バイオセンサー・チップを活性化した。gD-mplを10mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、およそ30μg/mlに希釈した。一部（35μL）を1μL/分の流速で注入し、およそ6400反応ユニット（RU）のカップリングしたタンパク質を達成した。最後に、1Mエタノールアミンをブロッキング剤として注入した。動力学的測定のため、PBS/Tween緩衝液（0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水）中、Fabの1.5段階希釈物を、25℃で20μL/分の流速を用いて注入した。SPR測定からの平衡解離定数 $K_d$ を、 $k_{off}/k_{on}$ として計算した。標準偏差、 $k_{on}$ に関する $s_{on}$ 及び $k_{off}$ に関する $s_{off}$ を、 $>4$ タンパク質濃度（ $k_{on}$ ）又は $>7$ タンパク質濃度（ $k_{off}$ ）を用いた測定から得た。解離データを単純 $AB \rightarrow A + B$ モデルに適合させ、 $k_{off} + / - s.d.$ （測定の標準偏差）を得た。見かけの一次速度定数（ $k_s$ ）を各会合曲線に関して計算し、タンパク質濃度の関数としてプロットし、 $k_{on} + / - s.e.$ を得た（適合の標準誤差）。得られた計算 $K_d$ における誤差 $e[K]$ は、誤差の増幅に関する以下の式： $e[K] = [(k_{on})^{-2}(s_{off})^2 + (k_{off})^2(k_{on})^{-4}(s_{on})^2]^{1/2}$ に従い推定した。ここで、 $s_{off}$ 及び $s_{on}$ は、それぞれ $k_{on}$ 及び $k_{off}$ における標準誤差である。

#### 【0189】

##### 実施例2

##### CATライブラリーからの抗体の単離

ファージ・ディスプレイされた抗体ライブラリーの構築については、以下の参照を参照のこと。WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438及びWO95/15388。簡単に述べると、図2及び3は、ファージの遺伝子3に融合した単鎖Fv（scFv）抗体を含む $6 \times 10^9$ 個の異なるクローンを含むファージ・ライブラリーの構築の概略を表している。抗原、この場合c-mplに対する結合選択は、図4に示され、以下により詳細に記載される方法に

より実施されうる。

#### 【0190】

##### (a) 抗原

ヒトc-mplを、F. de Sauvageら、Nature 369: 533 (1994)により記載されているようにしてクローニングした。

#### 【0191】

##### (b) イムノチューブにおけるファージ選択

NUNCイムノチューブを、10マイクロg/mlのgD-c-mplを含むPBSの溶液2mlで、4℃で一晩コーティングした。PBSで濯いだ後、チューブを3%粉乳を含むPBS (MPBS) で2時間室温でブロッキングした。第一ラウンドでは、室温で1時間ブロッキングのため $\sim 1 \times 10^{12}$  c.f.uを含むC. A. T. 抗体ファージ・ライブラリー10 $\mu$ lを1mlのMPBSに添加した。ブロッキングされたファージをコーティングされたチューブに添加し、ファージの抗原への結合を、回転輪の上で37℃で2時間継続させた。チューブをPBS-TWEENで6回、PBSで6回洗浄し、その後室温で10分間100mMTEAでファージを溶出させ、500 $\mu$ lの1M TRIS (pH7.4) で中和し、必要時まで氷上で保存した。その後のラウンドでは、PBS-TWEENでの洗浄を20回、PBSでの洗浄を20回まで増加させた。

#### 【0192】

溶出したファージを用いて5mlの対数増殖期の大腸菌TG1細胞を感染させ、2%グルコース及び100 $\mu$ g/mlカルベニシリンが補足された2YT寒天上に播いた。30℃で一晩増殖させた後、コロニーを10mlの2YTへ削り取った。この溶液50 $\mu$ lを用いてカルベニシリン及びグルコースを含む25mlの2YTへ接種し、37℃で2時間振とうしながらインキュベートした。ヘルパー・ファージM13K07 (ファルマシア) を10m.o.i.で添加した。吸着後、細胞をペレット化し、カルベニシリン (100 $\mu$ g/ml) 及びカナマイシン (50 $\mu$ g/ml) を含む25mlの2YTに再懸濁させ、30℃で4時間増殖を継続させた。遠心分離により大腸菌をファージから除去し、これらのファージ1ml (約 $10^{12}$  c.f.u.) をその後の選択ラウンドにおいて用いた。

#### 【0193】

(c) ストレプトアビジンでコーティングされた常磁性ビーズを用いた抗体ファージ選択

ライブラリーを、可溶性のビオチン化された抗原及びストレプトアビジンでコーティングされた常磁性ビーズを用いても選択した（図5を参照のこと）。gD-c-mplは、製造業者の推奨に従いIMMUNOPURE NHS-ビオチン（ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミド、ピアース（Pierce））を用いてビオチン化した。

#### 【0194】

選出の第1ラウンドでは、10 $\mu$ lのファージ・ライブラリーを、室温で回転輪の上で1時間、1mlのMPBST（3%粉乳粉末、1 $\times$ PBS、0.2%TWEEEN20）でブロッキングした。その後、ビオチン化されたgD-c-mplを100nMの最終濃度になるように添加し、回転器の上で37 $^{\circ}$ Cで1時間、ファージを抗原へと結合させた。その間、ストレプトアビジン（DYNAL）でコーティングされた300 $\mu$ lのDYNABEADS M-280を1mlのMPBSTで3回洗浄し（DYNAL磁気粒子濃縮器（DYNAL Magnetic Particle Concentrator）を使用）、その後回転器の上で1mlの新鮮なMPBSTで37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロッキングした。ビーズをMPCで回収し、50 $\mu$ lのMPBSTに再懸濁させ、ファージ・プラス抗原溶液に添加した。室温で15分間輪上で混合を継続した。その後、DYNABEADS及び付着したファージを、1mlのPBS-TWEEENで3回、MPBSTで1回、次にPBSで3回、の合計7回洗浄した。室温で5分間、300 $\mu$ lの100mMトリエチルアミンと共にインキュベートすることにより、ビーズからファージを溶出させた。ファージ含有上清を除去し、150 $\mu$ lの1M TRIS-HCl（pH7.4）で中和した。中和されたファージを用いて、前記のようにして対数増殖期中央（mid-log）のTG1宿主細胞を感染させた。ファージの播種、誘導及び収集も、チューブでの選択と同様に行った。

#### 【0195】

ビオチン化gD-c-mplにおける選択の第2及びその後のラウンドでは、1mlの収集されたファージ（およそ10<sup>12</sup>cfu）を200 $\mu$ lの10%粉乳、6 $\times$

PBS、0.3%TWEEN20でブロッキングした。抗原濃度は選択のラウンド毎に減少させた。一つの系列において、濃度は、第1ラウンドでは100nM、第2ラウンドでは10nM、第3ラウンドでは1nMであった。第二の選出は、第1ラウンドでは100nM、第2ラウンドでは100nM、第3ラウンドでは50nM、第4ラウンドでは10nM、第5ラウンドでは1nMを用いて行った。洗浄のストリレンジンシーは、第2ラウンドでは7回の洗浄を2サイクル、第3ラウンド以降では3サイクルに増加させた。

#### 【0196】

##### (d) 選択されたクローンのELISAスクリーニング

選択の各ラウンドの後、個々のカルベニシリン耐性コロニーを、ELISAによりスクリーニングし、c-mpl結合ファージを産生するコロニーを同定した。2つ又はそれ以上のアッセイ・フォーマットにおいて陽性であったクローンのみを更に研究した。図6はファージELISA手順を図示している。

#### 【0197】

個々のクローンを96穴組織培養プレート中の2%グルコース及び100 $\mu$ g/mlカルベニシリンを含む2TYに接種し、濁るまで増殖させた。その後、培養物に10m.o.i.のM12KO7ヘルパー・ファージを感染させ、感染した細胞を、増殖のため、一晚30℃で穏和に振とうしながら、カルベニシリン(100 $\mu$ g/ml)及びカナマイシン(50 $\mu$ g/ml)を含む2YT培地に移した。

#### 【0198】

NUNC MAXISORPマイクロタイター・プレートを、4℃で一晩、1ウェル当たり50 $\mu$ lの、gD-c-mpl、BSA、又はgD-gp120を2 $\mu$ g/mlで含む50mM炭酸緩衝液(pH9.6)でコーティングした。抗原を除去した後、室温で2時間、3%粉乳を含むPBS(MPBS)でプレートをブロッキングした。

#### 【0199】

ファージ培養物を遠心分離し、100 $\mu$ lのファージ含有上清を、室温で1時間、20 $\mu$ lの6 $\times$ PBS/18%粉乳でブロッキングした。タイタープレートからブロッキング剤を除去し、ブロッキングされたファージを添加し、室温で1

時間結合させた。洗浄後、1 : 5 0 0 0 希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗M13抗体 (Pharmacia) を含むMPBS、次に3' , 3' , 5' , 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) でファージを検出した。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加により反応を停止させ、A<sub>450nm</sub>からA<sub>405nm</sub>を差し引くことにより読み取りを行った。

#### 【0200】

##### (e) 可溶性 s c F v E L I S A

可溶性 s c F v は、3 0 °C でカルベニシリン (1 0 0 μg/ml) 及び I P T G (1 mM) O N を含有する 2 Y T 内で増殖させることにより、クローンの細菌上清の中で誘導した。E L I S A プレートには、g D - c - m p l、又は E L I S A 捕獲の場合には抗 - c - m y c M a b 9 E 1 0 のいずれかのコーティングをほどこした。プレートは、1 × E L I S A 希釈液 (0. 5 % の B S A、0. 0 5 % の T w e e n 2 0、pH 7. 4 で補足された P B S) でブロッキングし、可溶性 s c F v は、1 0 0 μl の上清に対し 6 倍希釈 E L I S A を 2 0 μl 添加することによってブロッキングした。抗原をコーティングしたプレートへの結合の後、まずは 1 ウェル当たり 1 μg/ml の M a b 9 E 1 0 を 5 0 μl、その後続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ネズミ I g、そして次に以上のとおりの T M B を添加することによって、可溶性 s c F v を検出した。捕獲 E L I S A については、ビオチニル化された c - m p l を添加しその後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ結合体、次に上述のとおりの T M B を添加することによって、可溶性 s c F v を検出した。

#### 【0201】

各ラウンドからの E L I S A によってスクリーニングされたクローンの数及びファージ E L I S A により陽性のクローンの数を表 3 に示す。

表 3 - C A T ライブラリからの抗 - c - m p l s c F v 抗体

スクリーニングされたクローン :	1 5 3 4
E L I S A により陽性のクローン :	3 6 1
B s t N I 及び配列決定による異なるクローン :	2 4
タンパク質を良好に発現するクローン :	1 7
K I R A によりアゴニストであるクローン :	9

BaF3増殖アッセイによりアゴニストであるクローン： 6

Hu3増殖アッセイによりアゴニストであるクローン： 4

#### 【0202】

(f) クローンのDNAフィンガープリント法

c-mpl-結合クローンの多様性は、リーダー配列の上流でアニーリングするプライマーpUC19R (5AGCGGATAACAATTTTCACACAGG3) (配列番号54) 及び遺伝子IIIの5末端においてアニーリングするfdtetsseq (5GTCGTCTTTCCAGACGGTAGT3) (配列番号55) を用いたscFvインサートを増幅するPCR及びそれに続く、頻繁に切断する制限酵素BstNI (図7参照) による消化によって決定した。

#### 【0203】

3%のアガロースゲル上の分析の後に見られた標準的パターンは、図8A-Cに示す。

#### 【0204】

DNAフィンガープリント法： プロトコル

混合物A：dH <sub>2</sub> O	67 $\mu$ l
10倍ampli Taq緩衝液	10
2.5mMMgCl <sub>2</sub>	10
DMSO, 50%	2
順方向プライマ	1
混合物B：2.5mMdNTP	8 $\mu$ l
AMPLITAQ	0.5
逆方向プライマ	1.0

反応用試験管の中に混合物Aを90  $\mu$ l入れる。

黄色チップを用いてE. Coliコロニーの非常にわずかな量を接種する。

PCRブロック内で98℃まで3分間加熱する。氷に移す。

混合物Bを10  $\mu$ lを添加する。

サイクル：90℃で30秒，55℃で30秒，72℃で1分20秒をPerkin Elmer 2400中で25サイクル。

1%のアガロースゲル上でのランのため10 $\mu$ lを除去する。1kBのバンドについてテストする。

残りの混合物を1倍のB s t N I 反応緩衝液にする。

5単位のB s t N I を添加する。

60℃, 2時間

3%METAPHORE アガロースゲル上で試料を電気泳動に付す。

#### 【0205】

(g) クローンの配列決定

各フィンガープリントの代表的クローンのヌクレオチド配列を得た。LB培地に2%グルコースと100 $\mu$ g/mlカルベニシリンを補足したもの50ml中にコロニーを接種し、30℃で一晩増殖させた。Qiagen Tip-100s及びメーカーのプロトコルを用いてDNAを分離し、蛍光ジデオキシ鎖ターミネータ (Applied Biosystems) でサイクル配列決定した。試料を、Applied Biosystems373A自動DNAシーケンサーに走らせ、「シーケンサ」プログラム (Gene Codes Corporation) を用いて配列を分析した。VH及びVL遺伝子を、抗体データベースV-BASEを用いて生殖細胞系列セグメントに割り当てた。

#### 【0206】

39のクローンについてDNA配列が得られ、24の異なるc-mpl-結合scFvsの結果としてもたらした。

#### 【0207】

(h) (his)<sub>6</sub>を用いたscFvsの精製

可溶性抗体のタンパク質精製のため、ファージミド (phagemid) DNAで、E. Coli菌株33D3を形質転換した。30℃で一晩培養物を増殖させるため、カルベニシリン及びグルコースを伴う5mlの2YTを使用した。これらの培養物0.2mlを同じ培地で200ml中に希釈し、約0.9のOD<sub>600</sub>まで増殖させた。細胞をペレット化し、IPTG (1mM) 及びカルベニシリン (100 $\mu$ g/ml) を含有する250mlの2YT中で、発現を誘導する目的で再懸濁させ、更に30℃で5時間増殖させた。細胞ペレットを収穫し-20℃で凍結させた。

#### 【0208】

固定化した金属キレートアフィニティクロマトグラフィ (IMAC) によって、抗体を精製した。凍結させたペレットを、1時間氷上で振とうさせることによって、氷冷shockate緩衝液 (25mMのトリス-HCl、1mMのEDTA、200mMのNaCl、20%のスクロース、1mMのPMSF) 10ml中に再懸濁させた。イミダゾールを20mMになるように添加し、細胞デブリを遠心分離で除去した。上清を1mM  $\text{MgCl}_2$  及び50mM、pH7.5のリン酸緩衝液まで調整した。Qia genからのNi-NTAアガロース樹脂をメーカーの指示どおりに使用した。pH7.5の50mMリン酸ナトリウム緩衝液、500mM NaCl、20mMイミダゾールで樹脂を平衡化し、shockateを添加した。結合は、バッチモードでか又は重力フローカラム上で起こった。その後、10床体積の平衡化緩衝液で2度、50mMになるまで増大させたイミダゾールを含有する緩衝液で2度、樹脂を洗浄した。タンパク質の溶離はpH7.5の50mMのリン酸緩衝液、500mM NaCl及び250mMイミダゾールで行った。PD-10カラム (Pharmacia) 上で余分な塩及びイミダゾールを除去し、タンパク質を、約1mlの体積になるまでCentricon10を用いて濃縮した。

#### 【0209】

1. 0の280nm=0.6mg/mlであると仮定して分光測光法で濃度を推定した。

#### 【0210】

これらのタンパク質調製物の一部分をKIRAアッセイ、c-mpl-Ba/F3細胞増殖アッセイ及びHu3細胞増殖アッセイに付した。

#### 【0211】

scFvクローン12B5、12D5、12E10、10D10、10F6、及び5E5のためのプラスミドDNA (それぞれpMpl.12B5.scFv.his;pMpl.12D5.scFv.his;pMpl.12E10.scFv.his;pMpl.10D10.scFv.his;pMpl.10F6.scFv.his;及びpMpl.5E5.scFv.hisと命名) が、米国ヴァージニア州ManassasのATCCに寄託された。

#### 【0212】



(i) gDtag, Fab', Fab' 2及び全長分子を用いたscFvに対する抗体の再フォーマット化

scFvの発現の改善のため及び、抗体のFab'及びFab' 2の形態のため、抗-c-mplクローンの一部を発現ベクターpAK19の誘導体にクローニングした(Carter et al. 方法: 酵素学における方法の手引. 3: 183-192 (1991))。発現は、リン酸塩飢餓によって誘導可能なE. Coliアルカリホスファターゼ(phoA)プロモータ(Chang, et al Gene 44: 121-125 (1986))の転写制御下にある。各ペプチド鎖には、E. Coliの細胞周辺腔への直接分泌を導くE. coliエンテロトキシンII(stII)シグナル配列が先行している(Picken, et al.)。このベクターはヒトk<sub>1</sub>C<sub>L</sub>(Palm et al., Infect Immun. 42: 269-275 (1983))及びヒトIgG1(C<sub>H</sub>1(Ellison, et al, Nucleic Acids Res. 10: 4071-4079 (1982)))定常ドメインも含んでいる。C<sub>H</sub>1遺伝子には、バクテリオファージλ<sub>to</sub>転写ターミネータが続いている(Scholtissek and Grosse Nucleic Acids Res. 15: 3185 (1987))。

#### 【0213】

(j) Fab'及びFab' 2の構築

Fab'及びFab' 2変異体の構築は、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発を用いて、stIIとV<sub>L</sub>ドメイン(SfiI), V<sub>L</sub>とCKドメイン(RsrII), stIIとV<sub>H</sub>ドメイン(MluI)及びV<sub>H</sub>とC<sub>H</sub>1ドメイン(ApaI)の結合部において非反復(unique)制限部位のpAK19内に挿入することによって容易になった。一価のFab'分子の発現を確保するため、C<sub>H</sub>1ドメインの3'末端にある遊離システインをトレニオンへと突然変異させ、これらのFab'分子はかくしてpAK19の場合のようなthr-cys-ala-alaではなくむしろthr-ala-ala-proというアミノ酸配列で終結する。Fab'分子の発現のためのこのベクターは、pXCA730と命名される。

#### 【0214】

ライブラリから誘導された抗体の一部は、カッパではなくラムダL鎖系から誘導されたL鎖を有していたことから、ヒトλC<sub>L</sub>は、pB11.2(Carter, P.

Garrard, L., Henner, D. 1991. 方法 : 酵素学における方法の手引、3:183-192 ) から pXCA730 の誘導体へとサブクローニングし、ベクター pXCA970 を提供した。

#### 【0215】

Fab' 2分子としての抗体の発現のために、pXCA730のC<sub>H</sub>Iドメイン上にヒトIgG1ヒンジ領域を付加するベクターが構築された。この後には、安定性のため酵母GCN4ロイシンジッパードメイン (Hu, et al. Science 250 : 1400-1403 (1990)) が続く。これらのDNAフラグメントは、合成されたオリゴヌクレオチドを用いて構築されたものであり、アミノ酸配列cys-pro-pro-cys-ala-pro-glu-leu-leu-gly-gly-arg-met-lys-gln-leu-glu-asn-lys-val-glu-glu-leu-leu-ser-lys-asn-tyr-his-leu-glu-asn-glu-val-ala-arg-leu-lys-lys-leu-val-gly-glu-arg (配列番号56) をコードする。得られたプラスミドはpXCA740と命名される。

#### 【0216】

scFv'sの可変ドメインは増幅され、PCR技術により、上述したベクター内へとサブクローニングするため制限部位が付加された。特異的オリゴヌクレオチドが、各V<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>領域について、以下に示したとおり設計された：

#### 【0217】

#### 【表4】

12B5, 12D5, 及び 10D10 L鎖可変:

5 プライマー  
GCT TCT GCG GCC ACA CAG GCC TAC GCT GAC ATC GTG ATG ACC C (SEQ.ID.NO: 57)  
3 プライマー  
ATG ATG ATG TGC CAC GGT CCG TTT GAT CTC CAG TTC GGT C (SEQ.ID.NO: 58)

12E10 L鎖可変:

5 プライマー  
GCT TCT GCG GCC ACA CAG GCC TAC GCT TCC TAT GTG CTG ACT C (SEQ.ID.NO: 59)  
3 プライマー  
CCT TCT CTC TTT AGG TTG GCC AAG GAC GGT CAG CTT GGT C (SEQ.ID.NO: 60)

10F6 L鎖可変

5 プライマー  
GCT TCT GCG GCC ACA CAG GCC TAC GCT CAG TCT GTG CTG ACT C (SEQ.ID.NO: 61)  
3 プライマー  
CCT TCT CTC TTT AGG TTG GCC AAG GAC GGT CAG CTT GGT C (SEQ.ID.NO: 60)

12B5 H鎖可変

5 プライマー  
CAT TCT ACA AAC GCG TAC GCT CAG GTG CAG CTG GTG GAG (SEQ.ID.NO: 62)  
3 プライマー  
GTA AAT GTA TGG GCC CTT GGT GGA GGA GGC ACT CGA GAC GGT GAC (SEQ.ID.NO: 63)

12D5 H鎖可変

5 プライマー  
CAT TCT ACA AAC GCG TAC GCT CAG GTG CAG CTG GTG GAG (SEQ.ID.NO: 64)  
3 プライマー  
GTA AAT GTA TGG GCC CTT GGT GGA GGA GGC ACT CGA GAC GGT GAC (SEQ.ID.NO: 63)

10D10 H鎖可変

5 プライマー  
CAT TCT ACA AAC GCG TAC GCT GAC GTG CAG CTG GTG CAG (SEQ.ID.NO: 65)  
3 プライマー  
GTA AAT GTA TGG GCC CTT GGT GGC GGC TGA GGA GAC GGT GAC (SEQ.ID.NO: 66)

12E10 H鎖可変

5 プライマー  
CAT TCT ACA AAC GCG TAC GCT CAG GTG CAG CTG CAG CAG (SEQ.ID.NO: 67)  
3 プライマー  
GTA AAT GTA TGG GCC CTT GGT GGA GGA GGC ACT CGA GAC GGT GAC (SEQ.ID.NO: 63)

10F6 H鎖可変

5 プライマー  
CAT TCT ACA AAC GCG TAC GCT CAG GTG CAG CTG CAG GAG (SEQ.ID.NO: 68)  
3 プライマー  
GTA AAT GTA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA AGA GAC GGT AAC (SEQ.ID.NO: 69)

## 【0218】

PCR反応は、s c F vを含有するプラスミドDNA 100ng、適切な5及び3プライマー、5  $\mu$ M、各200  $\mu$ MずつのdNTP、10mMKCl、6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mMトリス-HCl、pH8.0、2mMMgCl<sub>2</sub>、1%トリトンX-100、100  $\mu$ MBSA及び2.5単位のPfuDNAポリメラーゼ (Stratagene)を用いて、実施した。増幅は、95℃で30秒、55℃で30秒、72℃で30秒の30サイクルについてのものであった。適切な制限酵素での消化の後、反応産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、約350bpのバンドをGene Clean IIキット (Bio 101, Vista, CA)を用いて分離した。L鎖可変領域のためのフラグメントを、あらかじめカッパイソタイプについてはSfiI及びR

s r l I で又ラムダイソタイプについてはS f i I 及びM s c I で消化されたベクター内に連結させ、E. Coli D H 5 a へと形質転換させた。望まれた組換え体を制限酵素分析を用いて同定し、望まれたフラグメントの存在を確認するべく配列決定した。その後、同様に、制限酵素M l u I 及びA p a I を用いてL鎖を含有するプラスミドにとH鎖可変ドメインをクローニングし、最終構築物をDNA配列決定により再び検査した。

#### 【0219】

##### (k) g D タグを伴う s c F v の構築

高密度発酵タンク内での増強かつ調節された発現のため、もとのライブラリの l a c Z プロモータ及びハイブリッドシグナル配列ではなくむしろ p h o A プロモータ及び s t I I シグナル配列を含む p A K 1 9 の誘導体に、p 1 2 B 5、p 1 2 D 5、p 1 0 F 6 及び p 1 2 E 1 0 の s c F v 形態の S f i I ~ N o t I フラグメントをサブクローニングした。精製を容易にするため、I 型単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D から誘導された 1 2 個のアミノ酸 (m e t - a l a - a s p - p r o - a s n - a r g - p h e - a r g - g l y - l y s - a s p - l e u) (配列番号 7 0) をコードする DNA フラグメント (Lasky 及び Dowbenko DN A (N.Y.) 3: 23-29 (1984)) を合成し、C. A. T. ライブラリクローン内にもともと存在する (h i s)<sub>6</sub> 及び c - m y c エピトープの代りに V<sub>L</sub> ドメインの 3 末端に挿入した。

#### 【0220】

##### (1) E. Coli における発現

s c F v - g D, F a b' 又は F a b' 2 分子のための遺伝子を含有するプラスミドを、以前に記述されたとおり (Carter et al. Bio/Technology 10: 163-167 (1992))、通気された 1 0 リットル入り発酵槽の中で 3 0 °C で約 4 0 時間増殖させた E. Coli 菌株 3 3 B 6 (W 3 1 1 0 D f h u A p h o A D E 1 5 d e o C 2 i l v G 2 0 9 6 (v a l<sup>R</sup>) d e g P 4 1 (D P s t I - K a n<sup>R</sup>) D (a r g F - l a c) 1 6 9 I N (r r n D - r r n E) 1) 内で発現させた。

#### 【0221】

### 例3

12B5、12D5及び12E10の全長ヒト抗体誘導体のクローニング及び発現

哺乳動物細胞内での全長抗体の発現のため、をFab構築物から、ヒトIgG1 CH1、CH2及びCH3ドメイン及びヒト抗体シグナル配列 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 4285-4289 (1992)) を含む発現ベクターpRKの誘導体 (Suva et al., Science 237: 893-896 (1987)) へと、H鎖可変ドメインをサブクローニングした。L鎖は、別のpRKプラスミドへとクローニングさせた。L鎖及びH鎖発現ベクターを、高効率手順 (Gorman et al, DNA Protein Eng. Technol. 2: 3-10 (1990)) により、アデノウイルス形質転換されたヒト胚性腎細胞系293へと同時トランスフェクションした。収獲した調整培地は、ELISAにより抗-mpl抗体を含有することが示された。

#### 【0222】

より安定な細胞系の産生及び高レベル抗体の産生のために、L及びH鎖wo、以前に記述されたSVI. DI発現ベクター内へと移動した (Lucas et al., Nucleic Acids Res. 24: 1774-1779 (1996))。このベクターは、発現ベクターpRKのイントロン内にマウスDHFR cDNAを含有し、メトトレキサート内での選択により発現増幅を可能にする。L鎖は、第2のSV40プロモータ/エンハンサーにより発現が駆動される状態で、同じプラスミドへとクローニングした。プラスミドをメーカーの指示どおりに線形化しリポフェクタミン (Gibco-BRL) を用いてCHO細胞内にトランスフェクションした。選択培地への移動の7~10日後に、クローンを、その後の研究のため96ウェルのプレートに分離するか又はプールして回転瓶内での培養のため拡張させた。

#### 【0223】

抗体の精製のための調整培地を回転瓶内で生成させた。細胞を回転瓶内に、5%のウシ胎児血清で補足された200mlの富有培地 (DMEM: Ham's F12 (1:1) 中  $2 \times 10^7$  細胞の初期細胞密度で播種した。約80%の集密性で、培地を、インシュリン ( $10 \mu\text{g/ml}$ )、トランスフェリン ( $10 \mu\text{g/ml}$ )、微量元素及び脂質アルコールで補足された無血清PS-24産生培地と交換した。調整培

地は、10日後に収獲した。

#### 【0224】

##### 例4

##### アゴニスト抗体の精製

##### (a) gDタグを伴うscFvの精製

1gm/ml TE (25mM トリス、1mMEDTA、pH7.4) の割合で凍結細胞ペー  
ーストを再懸濁させ、氷上で18時間、穏やかに攪拌した。30分間10,000×gの遠心分離で、細胞デブリを除去した。上清を、PBSで平衡化されたC  
NB rセファロースにカップリングされた抗gDモノクローナル抗体5B6 (Pa  
borsky, L. R. et al., Protein Eng. 3; 547-553 (1990)) からなるアフィニテ  
ィカラム (2.5×9.0cm) に付した。カラムを18時間PBSで洗浄し、そ  
の後、カラム流出液の吸光度が基線と等価になるまで、1MのNaClを含有す  
るPBSで洗浄した。すべての段階は、25cm/時の線形流速で4℃で行った。  
溶離をpH2.7の0.1M酢酸、0.5M NaClを用いて行った。カラム分画  
を280nmの吸光度により監視し、ピーク分画をブールし、pH8.0の1.0M  
トリスで中和し、PBSに対し透析し、無菌ろ過した。結果として得られたタン  
パク質調製物を、非還元性SDS-PAGEにより分析した。

#### 【0225】

##### (b) Fab' 分子の精製

Fab' 分子の精製のためには、TE (pH7.4の25mMトリス、1mMEDT  
A) 5mlの中に凍結細胞ペースト5gを再懸濁させ、氷上で18時間穏やかに攪  
拌した。shockateのpHを、2M HClを用いて5.6に調整し、沈殿物及び細胞  
デブリを10,000×gで30分間遠心分離により除去した。あらかじめpH5  
.5の20mMESで平衡化した1mlのBAKERBOND ABxカラム (0  
.5×5.0cm) (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) に上清を付した。20mM  
MESで基底値になるまで洗浄した後、153cm/時の流速で、20mNaOAc、  
0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH7.2の0~100%の10ml線形勾配を用い  
て、Fab' を溶離させた。Fab' を含有する分画をブールし、緩衝液をPB  
Sと交換した。

#### 【0226】

##### (c) Fab' 2分子の精製

pH7.4の25mMトリス、5mMEDTA、1mMNa<sub>3</sub>N<sub>3</sub> 10体積中に凍結した細胞ペースト(100gm)を解凍させ、マイクロフルイダイザ(TECH-MAR)内に3回通すことによって破碎した。PMSFを1mMまで加え、30分間10,000×gでの遠心分離により細胞デブリを除去した。その後上清を0.45μm及び0.2μmのSUPORCAPフィルター(Gelman)を通してろ過し、PBSで予備平衡化された50mlのセファロース高速流プロテインGカラム(Pharmacia)に付した。PBSで基底値になるまで洗浄した後、pH2.3の0.1Mグリシンエチルエステルを用いてFab' 2をpH8.0の1Mトリス1/10体積の入った試験管の中へと溶離させた。Fab' 2を含有する分画をプールし、30キログルトンの分子量のカットオフでUltrasetteにより濃縮させて、緩衝液を20mMNaOAc、0.01%オクチルグルコシド、pH5.5と交換した。この材料を、あらかじめ20mMNaOAcで平衡化した30mlのS-セファロースカラム(Pharmacia)に付し、pH5.5の20mMNaOAcで基底値になるまで洗浄し、10カラム体積全体にわたり25mMNaOAc中0~1MNaClの線形勾配で溶離させた。Fab' 2を含有する分画をプールし、緩衝液をPBSと交換した。

#### 【0227】

##### (d) トランスフェクションされたCHO細胞上清からの全長抗体の精製

回転瓶から収獲した調整培地を、あらかじめPBSで平衡化した5mlのプロテインAセファロースカラム(1.0×5.0cm)に付し、PBSで洗浄し、次に1MNaClを含有するPBSで基底値になるまで洗浄した。pH2.9の0.1MHOAc、0.5NNaClで抗体を溶離させ、1Mトリスで中和し、緩衝液をPBSと交換した。

いくつかの抗体及びそのフラグメントについてのアゴニスト抗体活性の要約を、下の表4に示す。

#### 【0228】

##### 【表5】

表 4

Mplアゴニスト抗体活性の概略

抗体	Hu3 結合 (ED50)	KIRA (ED50)	Hu3 結合 (IC50)	Mpl/TPO ELISA (IC50)	血小板 (IC50)	MKアッセイ
12B5 scFv	20 pM	1 nM	10 nM	17nM	100 nM	++
Fab	>1 $\mu$ M	3 nM	900 nM	none	>1 $\mu$ M	-
Fab2	5 pM	1 nM	5 nM	1 nM	300 nM	+
IgG	30 pM	400 pM	10 nM	152 pM	300 nM	-
12E10 scFv	5 pM	60 pM	5 nM	1.6 nM	5 nM	
Fab	>1 $\mu$ M	>1 $\mu$ M	500 nM	180 nM	>1 $\mu$ M	
Fab2	>1 $\mu$ M	160 pM	10 nM	640 nM	500 nM	
IgG	>1 $\mu$ M	480 pM	50 nM	450 pM	500 nM	
12B5 scFv	1.2 nM	280 pM	10 nM	24 nM	>1 $\mu$ M	
Fab	>1 $\mu$ M	4 nM	500 nM	1 $\mu$ M	>1 $\mu$ M	
Fab2	4.8 pM	600 pM	4 nM	1 nM	100 nM	+
IgG	>1 $\mu$ M	3 nM	10 nM	450 pM	500 nM	

## 【0229】

## 例5

もう1つの実施形態においては、本発明は受容体タンパク質に結合し受容体タンパク質を2量体化する抗体を選択する方法を提供する。この方法では、結合標的として2つのタンパク質サブユニットをもつ受容体タンパク質を用いて、抗体ライブラリを選び分ける。このライブラリは、mplアゴニスト抗体について上述したとおりに選り分けられる。好ましくは、抗体はヒトのものであり、より好ましくはモノクローナルである。ライブラリは、適切には、好ましくはファージ表面上で表示された1本鎖抗体ライブラリである。ファージ表面上の抗体を含むタンパク質の表示は、上述のとおり当該技術分野において周知であり、これらの既知の方法を本発明において使用することが可能である。抗体ライブラリは同様に、例えば英国、ケンブリッジのCambridge Antibody Technologies (CAT) から市販されている。好ましくは、本発明の方法により選択された抗体は、受容体を2量体化することによって受容体を活性化し、かくして、その受容体のための天然の内因性リガンドが受容体を結合するときに生み出されるエフェクタ成果と類似したエフェクタ成果を達成する。

## 【0230】

本発明の方法は、既知であってかつ／又はクローニングされうる2つの構成要素をもつ任意の受容体に対するアゴニスト抗体を発見するために使用可能である。本発明の方法は2量体化により活性化されるあらゆる表示された受容体と結合



する抗体の選択を可能にすることから受容体タンパク質の一次、二次又は三次構造を知っている必要はないものの、この情報はクローニングなどのために有用である。数多くの既知の受容体タンパク質は、2量体化によって活性化され、これらの既知の受容体のいずれでも本発明において使用可能である。適切な受容体としては、キナーゼ活性が欠如したチロシンキナーゼ受容体及び造血受容体が含まれる。

#### 【0231】

s c F vによるチロシンキナーゼ受容体のような受容体の活性化は、予想外の結果である。受容体活性化の現行の知識では、内因性のチロシンキナーゼ活性が欠如した（ただし細胞間キナーゼと会合する）チロシンキナーゼ受容体及び造血サイトカイン受容体を内含する数多くのクラスの受容体について、受容体活性化における主要な事象であるのは、リガンドにより媒介される2量体化事象であることが立証されている。この見解は受容体リガンド複合体の結晶構造ならびにある種のモノクローナル抗体（これらの抗体のF a b' フラグメントではなく）の証明されたアゴニスト能によって支持されている。したがって一本鎖抗体が、受容体2量体化及び活性化を惹起することができるとは予想されないであろう。

#### 【0232】

M u S Kは、神経筋接合部のシナプス後表面に局在化した、最近同定されたチロシンキナーゼである (Valenzuela et al., 1995, Neuron, 15, 573-584)。M u S Kを欠損させられたマウスは、神経誘導されたシグナリング分子アグリンが欠如したマウスにおいて観察される (Gautam et al., 1996, Cell 85 525-535) のきわめて類似した表現型である、神経筋接合部を形成できない (Dechiara et al., 1996, Cell 85, 501-512)。アグリンシグナリングにおけるM u S Kの関与の化膿性は、アグリンが、M u S Kの速やかなチロシンリン酸化を誘発すること及び、標識付けされたアグリンがM u S Kに対し化学的に架橋結合するという観察事実によって高められる (Glass et al., 1996, Cell 85 513-523)。

#### 【0233】

神経筋接合部の形成は、ニューロン末端に近い筋線維上の膜の分化及びこの接合部に近い核の中の遺伝子発現の変化を含むプロセスを通して達成される。(Bo

we et al., 1995, *Annu-Rev-Neurosci.* 18 443-462及びKleiman et al., 1996, *Cell* 85 461-464; において再考されている)。この複雑なプロセスの驚くべき特長は、筋管膜内のAChRsの再分布及び濃縮である。アグリンは、このAChRのクラスタ化ならびにシナプス器の細胞外マトリックス及び細胞骨格構成要素の変化を誘発することができる (Bowe et al., 前出, Godfrey et al., 1984, *J. Cell Biol.* 99 615-627; Nitkin et al., 1987, *J. Cell Biol.* 105 2471-2478)。アグリンは、プロテアーゼ阻害物質に類似するEGF反復、ラミニン様の球状ドメイン、及び配列の複数のコピーを含有する～200kDaのコア分子量をもつ分泌タンパク質である。これは、運動ニューロン末端によって放出され、シナプス間隙の基底板の中に維持される。アグリンは、見かけ上高い親和力でMuSKと結合しない (Glass et al., 前出) が、それは、神経筋接合部に存在するその他の分子、最も顕著にはアルファージストログリカンと相互作用することが報告されており (OToole et al., 1996, *Natl. Acad. Sci. USA.* 93 7369-7374)、かくしてアグリンにより開始されるシグナリング事象におけるMuSKの役割の分析が複雑になっている。

#### 【0234】

例えばM13ファージ上で発現されたscFvのさまざまなライブラリを選び分けることによって同定された抗原特異的scFvは、特異的な治療活性を媒介することのできる分子の供給源を提供し、MuSKのような新規の又は最近同定された分子の機能を研究するための迅速で新しいアプローチを提供する。以下では、受容体活性化を媒介するscFvが同定されており、その直接的MuSK活性化は、アグリンで観察されたものと類似のAChR分布及びチロシンリン酸化の変化を誘発する。

#### 【0235】

scFv抗体によるAChRクラスタ化及びチロシンリン酸化の誘導は、この最近発見されたチロシンキナーゼが神経筋接合部の形成における主要な事象を誘導するように作用することを示す、MuSK欠損ノックアウトマウスの研究からひき出された結論を裏づけるための直接的な証拠を提出している。アグリンの潜在的なシグナルトランスジューサとして、MuSKがアグリンに結合する高い親

和力を示しておらず、アグリンシグナルの媒介に関与している更なるアグリン結合成分が存在するはずであるとの推測が導き出される、ということも留意に値する。この成分の分子特性は未知である。MuSKに特異的に導かれた物質で、アグリンの折紙付きの活性である受容体のクラスタ化を誘導することができるというのは興味深いことである。

#### 【0236】

除神経又は筋肉固定化の後の筋肉内のMuSKの発現の顕著なアップレギュレーションならびに、fukiyama筋ジストロフィに関連する領域内のMuSKの染色体局在化は、神経筋接合部の調節におけるこの分子の重要な役割を示すものであり (Valenzuela et al., 前出)、MuSK活性の制御された調節を通して治療硬化が得られるという可能性を示している。アグリンは、神経筋接合部のみならずさまざまな末梢及び中枢ニューロン内で発現されることから (Bowe et al., supra; Rupp et al., 1991, Neuron 6 811-823; Tsim et al., 1992, Neuron 8 677-689) 外因的に導入されたアグリン誘導体が神経筋接合部に制限されない結果を惹起する可能性があるため、MuSK機能を操作するのに用いる最適な分子候補ではないかもしれない。かくして、比較すると、scFvを通してMuSKの直接的活性化を得る能力は、魅力的な1つの代替案を提供する。テストされたscFvの各々は、nM範囲内のMuSKに対する親和力を示しており、高い親和力ときわめて特異的な分子の豊富な供給源としての、ファージ表示されたscFvライブラリの有用性を立証している。

#### 【0237】

したがって、本発明の抗体は、試料組織内のMuSK受容体のアップレギュレーションをアッセイし、このアップレギュレーションに付随する神経筋損傷の程度を求める上で有用である。これらの抗体はまた、これらの抗体のアゴニスト特性の直接的結果として、MuSK受容体を活性化し、神経筋接合部におけるACHRクラスタ化を誘導するのに有用である。除神経又は筋肉固定化、例えば筋ジストロフィーなどに苦しむ人に対して抗体を投与することによって、これらの人々における神経筋接合物の機能を改善する方法が提供される。

#### 【0238】

アゴニスト活性をもつ s c F v を調製するためには、Mu S K の細胞外ドメイン及び造血サイトカイン受容体 c-Mp l (トロンボポエチン、T P O に対する受容体) の細胞内ドメインからなるキメラ Mu S K-Mp l 受容体を通して因子依存性細胞系における増殖性応答を誘導する抗体が選択される。c-Mp l の活性化は、成長ホルモン受容体、エリスロポエチン受容体及びこのクラスのその他の関連する受容体の場合がそうであるように、ホモ 2 量体化を必要とすると考えられている (Carter et al., 1996, Annu-Rev-Physiol 58 187-207; Gurney et al., 1995, Proc Natl, Acad Sci. USA 92 5292-5296)。Mu S K-Mp l を発現する Ba / F 3 細胞を I L-3 について窮乏させ、可溶性タンパク質として発現された一連の濃度範囲の各 s c F v に露呈させた。驚くべきことに、21 の s c F v のうち 4 つが、Mu S K-Mp l 発現細胞内で、頑強な増殖性応答を誘導することができた (図 11)。この活性は、s c F v の nM の濃度で観察された。s c F v は、親のトランスフェクションされていない Ba / F 3 に対し効果を示さなかった。アゴニスト s c F v から誘導された I g G の間では、アゴニスト活性も存在していたが、非アゴニスト s c F v から誘導された I g G においては認められなかった。可溶性アグリン C 末端ドメイン (c-アグリン) は、効果が無く、アグリンが直接 Mu S K と直接は結合しないという前出の観察事実を裏づけた。アグリンの C 末端ドメインは、アグリンの A C h R クラスタ化活性を含むことが知られており、神経筋接合部の形成にとっては不可欠である (Ruegg et al., 1992, Neuron 8 691-699; Tsim et al., 前出)。増殖の誘導能についての E C<sub>50</sub> は、s c F v 又は I g G のいずれかとして発現されたときの大部分の活性なアゴニストクローンについて 5 nM であった。Mu S K に対するこれらの s c F v 及び I g G の親和力は、BIAcore™ 分析を用いて決定された。アゴニスト s c F v 及びいくつかの非アゴニスト s c F v は各々、5 ~ 25 nM の範囲内で Mu S K についての親和力を示した。これとは対照的に、Mu S K についての I g G の親和力は 10 ~ 30 pM であった。下表 5 を参照のこと。

【0239】

【表 6】

表 5

クローン#	アゴニスト	$K_d$	$K_B$	親和性
musk #2-scFv	+	$3.34 \times 10^{-3}$	$8.78 \times 10^5$	3.8 nM
musk #3-scFv	-	$2.39 \times 10^{-3}$	$1.05 \times 10^5$	23 nM
musk #4-scFv	+	$1.57 \times 10^{-3}$	$1.84 \times 10^5$	8.5 nM
musk #5-scFv	-	$2.49 \times 10^{-3}$	$5.29 \times 10^5$	4.7 nM
musk #6-scFv	-	$4.95 \times 10^{-3}$	$1.05 \times 10^5$	4.7 nM
musk #13-scFv	+	$2.32 \times 10^{-3}$	$4.53 \times 10^5$	5.1 nM
musk #22-scFv	+	$6.09 \times 10^{-3}$	$1.27 \times 10^5$	4.8 nM
musk #13-IgG	+	$1.01 \times 10^{-5}$	$8.05 \times 10^5$	12.5 pM
musk #22-IgG	+	$4.86 \times 10^{-5}$	$1.65 \times 10^6$	29.5 pM

## 【0240】

このアゴニスト活性を更に証明するため、全長MuSKチロシンキナーゼのチロシンリン酸化の誘導能について、scFvを試験した。筋管分化を促進する条件下でネズミ筋芽細胞系C2C12を培養し、その後scFv, IgG又はc-アグリンに露呈させた。以前のデータ (Glass et al., 前出) と一致して、c-アグリンは、MuSKチロシンリン酸化を誘導することができた。アゴニストscFv及びIgGはまた、抗ホスホチロシン抗体でのウエスタンブロット分析によって求められるように、MuSKのチロシンリン酸化を急速に誘導することが認められ、一方その他のscFv及び非アゴニスト抗-MuSK IgGでは効果がなかった。

## 【0241】

培養されたC2C12筋管内でAChRのクラスタ化を誘導するscFvMuSKアゴニストの能力について試験した。刺激の後、細胞を固定し、細胞表面AChRの分布を、ローダミン標識ブンガラトキシンで明らかにした。未分化の筋芽細胞においては、AChRを、c-アグリン、scFv又はIgGの存在下で分散させ集束解除 (unfocus) させた。対照的に、筋管分化においては、c-アグリン及びアゴニストscFv及びIgGは、大きくかつ強く染色されたクラスターへのAChRの顕著な凝集を誘導した。MuSKに対し誘導された非アゴニストscFv及び非アゴニストIgG又は関連性のない抗原は、効果がなかった。アグリン作用の付加的な結果である、AChRのサブユニットのチロシンリン酸化もまた、受容体及び受容体鎖を認識する抗血清を利用して試験した。受容体及び受容体鎖の両方のチロシンリン酸化レベルは、c-アグリンならびにアゴニストscFv及びアゴニストIgGにより著しく誘導されたが、対照のscFv及びIgGによっては影響されなかった。

#### 【0242】

本発明のMuSKアゴニスト抗体の変異体は、トロンボポエチン抗体について上述されたとおりに調製することができる。

#### 【0243】

発現ベクターの構築。

ネズミMuSKのためのコード配列を、PCR増幅によって得た。MuSK-Fcを、真核性発現ベクターpRK5tkNEO内でのヒトIgG1のFc領域と同一枠内でのMuSKの細胞外ドメイン（アミノ酸1～492）の融合によって調製した。293個の細胞内で、MuSK-Fcを過渡的に発現させ、プロテインGカラム上で精製した。MuSKの細胞外ドメイン（アミノ酸1～492）及びヒトc-Mp1受容体の膜貫通及び細胞内ドメイン（アミノ酸491～635）からなるキメラ受容体MuSK-Mp1を、逐次PCRにより調製し、pRK5tkNEOにクローニングした。Ba/F3細胞内への線形化されたベクター（20μg）の電気穿孔法（500万細胞、250ボルト960μF）とそれに続く2mg/mlのG418によるネオマイシン耐性についての選択により、キメラ受容体を発現する安定した細胞系統を得た。pRK5tkNEO内の全長MuSKを293個の細胞内にトランスフェクションし、2週間のG418選択（400μg/ml）の後安定した形質転換体を得た。DNA構築物の配列を、DNA配列決定によって確認した。MuSKの発現を、以下で記述するとおり、フローサイトメトリー分析によって査定した。Ba/F3細胞を、10%のウシ胎児血清とIL-3の供給源としてのWEHI-3B細胞からの5%の調整培地とで補足されたRPMI1640培地の中に維持した。N末端に融合されたジーンナーゼ開裂部位（MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVVRGKYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLLEGGA AHYALLPG）（配列番号71）及びエピトープタグ及びgDシグナル配列との融合タンパク質として、発現ベクターpRK-gD-c-Agrinを伴う無血清培地内の293個の細胞から、過渡的トランスフェクションにより、c-アグリン（ラットアグリンのアミノ酸1137-1949（Ag+8活性スプライス形態（Ferns et al., 1993, Neuron 11 491-502））を発現させた。

#### 【0244】

s c F v 及び I g G の分離。10  $\mu$ g/ml で Maxisorp 試験管 (Nunc) 上に Mu S K - F c 免疫アドヘシンをコーティングした。ヒト s c F v のライブラリ (Cambridge Antibody Technology, イギリス) を、基本的に記述されたとおりに (Griffiths et al, 199, EMBO-J12 725-734) 2 回の富化のラウンドを通して選り分けた。個々のクローンの特異性は、まず最初に、Mu S K - F c 及び対照免疫アドヘシン (CD 4 - F c) を用いて elisa (Griffiths et al, 前出) によって評価した。陽性クローンを PCR によりスクリーニングし、B s t N 1 消化によって「フィンガプリンティング」した (Clackson et al., 1991, Nature 352 642-648)。非反復パターンをもつクローンの例を配列決定し、Mu S K を発現する又は発現しない細胞を用いて、FACS 分析に付した。FACS 分析のためには、細胞 (10<sup>5</sup>) を、まず最初に 30  $\mu$ l の 10% FBS / PBS 中でのインキュベーションによってブロッキングされた 10<sup>10</sup> 個のファージと共に、2% の FBS / PBS (ウシ胎児血清 / リン酸緩衝塩溶液) 200  $\mu$ l 中で 4℃ で 60 分間インキュベートした。その後、細胞を 2% の FBS / PBS で洗浄し、抗 - M 1 3 抗体 (Pharmacia, Piscataway NJ) 及び R - フィコエリスリン結合ロバ抗ヒツジ抗体 (Jackson Immunoresearch, West Grove PA) で染色し、FACS 分析によって分析した。モノクローナル抗体 9 E 1 0 により認識された c - m y c タグ配列 (Griffiths et al, 前出) 及びポリヒスチジンテール (h i s 6) を含むエピトープタグ付けタンパク質として、細菌内で S c F v を発現させ、これをメーカー (Q i a g e n) が推奨するとおりにイミダゾール溶離による N i - N T A カラム上で精製した。I g G としてのクローンの発現のためには、s c F v の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域をコードする配列を PCR により、カッパ型 I g G の全ヒト L 及び H 鎖の発現を可能にするように設計された哺乳動物発現ベクター p I g G - k a p p a の中に導入した。個々のクローンのための発現ベクターを CHO 細胞内にトランスフェクションし、無血清調整培地から I g G を収獲し、プロテイン A カラム上で精製した。

#### 【0245】

増殖アッセイ

細胞を22時間IL-3の不在下で培養した(10%のFBSを補足したRPMIで)。次にRPMIで2回細胞を洗浄し、96ウェルの皿の中で、指示された濃度のscFv又はIgGで補足された7.5%のFBS RPMI 0.2 ml中で1ウェル当たり50000細胞の割合でプレーティングした。各濃度を、二重に試験した。16時間のインキュベーションの後、1ウェルにつき1  $\mu$ Ciの [ $^3$ H] -チミジンを追加し、更に6時間インキュベーションを続行した。 [ $^3$ H] -チミジンの取込みを、Top Count Counter (Packard Instruments, CA) で測定した。

#### 【0246】

ACHRクラスタ化検定。

高グルコースDMEM中の10%のFBS内でC2C12を、subfluencyの状態に維持した。ACHRクラスタ化アッセイのためには、フィブロネクチン及びポリリシンでコーティングされたガラススライド上にC2C12を播種し、2%のウマ血清高グルコースDMEM内での48時間のインキュベーションによって、筋管分化を誘導した。scFv又はc-アグリンを培地に添加し、一晚(16時間)インキュベートした。次に細胞を、PBSで洗浄し、4%のparaホルムアルデヒド中で固定させた。記述されたとおり(Ferns et al. 前出) ACHRsの局在化を明らかにするためローダミン結合ブングロトキシン (Molecular Probes, Eugene OR) を使用した。

#### 【0247】

結合親和性分析

記述されたとおり(Mark et al, 1996, J. Biol. Chem. 271 9785-9789) BIAcore<sup>TM</sup>計器を用いたタンパク質相互作用分析を実施した。簡単に言うと、研究グレードのCM5センサーチップを、5  $\mu$ l/分の流速で1:1のN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩とN-ヒドロキシスクシンイミドを20  $\mu$ l注入することによって活性化させた。pH5.0の10mM酢酸ナトリウム中のMuSK-Fc 20  $\mu$ lを20  $\mu$ g/分の割合でセンサーチップ上に注入し、続いて30  $\mu$ lのエタノールアミンを注入した。scFv及びIgGを精製し、Pearce BCAキットにより濃度を決定した。Kinject法



により10  $\mu$ l/分の流速で、0.05%Tween 20を伴うPBS中の30  $\mu$ lのタンパク質試料を注入した。0.05%Tween 20を伴うPBS流の中で20分間、タンパク質を解離させた。Pharmacia Biosensor ABからのBIA evaluation 2.1ソフトウェアでセンサグラムを分析した。A+B=ABのI型適合でセンサグラムを評価することによって、見かけの解離速度定数(K<sub>d</sub>)及び会合速度定数(K<sub>a</sub>)を得た。平衡解離定数K<sub>d</sub>は、K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>として計算した。

#### 【0248】

##### 免疫沈降とウェスタンブロット分析

10%のFBS高グルコースDMEM内にC2C12を維持し、2%ウマ血清中で72時間インキュベートすることにより分化を誘導した。次に細胞を、図中に示された時間、c-アグリン、scFv又はIgGを添加することによって刺激した。ScFv及びIgGは、50nMで使用した。調整培地を含むc-アグリンは、最大チロシンリン酸化を提供するレベルで使用した。細胞抽出物は、記述とおり(Gurney et al, 前出)に調製した。30  $\mu$ lのアガロース結合抗ホスホチロシンモノクローナル抗体4G10 (UBI inc, Lake Placid NY) 又は1  $\mu$ gの抗MuSK IgG #13とそれに続く30  $\mu$ lのプロテインAセファロースビーズと共に、抽出物を60分間4℃でインキュベートした。抗ホスホチロシン抗体4G10又は抗AChR抗体(Affinity Bioreagents, Golden CO)を用いたウェスタンブロット分析をメーカーが推奨するとおりに行い、HRP結合2次抗体及びECL (Amersham) でこれらを明らかにした。

#### 【0249】

非変性ゲル電気泳動により解像されると、MuSK scFvは2量体として容易に観察される。更に、2量体種の発生量は、細胞表面上で受容体に結合されたscFvの局所的状況において、著しく変わりうる。代替的には、この場合MuSK-Fcである2価の抗原でscFvファージライブラリをスクリーニングすることにより、受容体2量体に結合し、その形成を容易にするscFvの直接的選択が可能となる。

#### 【0250】

本発明は、必然的に好ましい実施形態及び特定の作業例に結びつけて記述さ

れてきたが、当業者であれば、以上の明細書を読んだ後、その精神及び範囲から逸脱することなく、本書中に記されている内容に対するさまざまな変化、等価物の置換及び変更を加えることができるだろう。かくして、本発明は、本明細書に特定の記述されたもの以外の形で実施することができる。したがって、該特許証により付与される保護は、添付の請求の範囲及びその等価物のみによって制限されることが意図されている。

【0251】

本書で引用されているすべての参考文献は、ここに参考として明らかに包含される。

【0252】

材料の寄託

以下の材料は、米国基準培養収蔵機関 (1080/University Boulevard, Manassas, Virginia, 20110-2209 USA (ATCC) に寄託された。

【0253】

【表7】

材 料	ATCC寄託番号	寄託年月日
pMpl.12B5.scFv.his	_____	1998年 8月18日
pMpl.12D5.scFv.his	_____	1998年 8月18日
pMpl.12E10.scFv.his	_____	1998年 8月18日
pMpl.10B10.scFv.his	_____	1998年 8月18日
pMpl.10F6.scFv.his	_____	1998年 8月18日
pMpl.5E5.scFv.his	_____	1998年 8月18日

【0254】

この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の規定及びそれに準ずる規則（ブダペスト条約）に基づいて行われた。これは、寄託日から30年間、寄託物の生存可能な培養の維持を確保するものである。この寄託物は、ブダペスト条約の条項に基づきATCCから入手可能であり、関連する米国特許の発行時点又はいずれかの米国又は外国特許出願の公開時点のうちいずれか先に発生した方の時点での寄託物の培養の後代の永久的かつ無制限の利用可能性を確保しかつ35 USC § 122及びそれに関連する特許局長規則（37 CFR § 1.14特に8860G638を含む）によってその権限を有する者として米国特許局長により決定された者に対して後代の利用可能性を確保するGe

netech, IncとATCC間の契約の対象となるものである。

【0255】

本出願の譲受人は、適切な条件下で培養された時点で寄託中の材料の培養が死枯、喪失したり又は破壊された場合、該材料を通知に基づき同じもので迅速に置換さすることに同意した。寄託された材料の利用可能性は、いずれかの政府の権限の下でその特許法によって付与された権利を侵害して該発明を実践する許諾とみなされるべきものではない。

【0256】

以上の明細書は、当業者が本発明を実施することを可能とするのに十分なものであると考えられる。寄託された実施形態は、発明のある局面を単に例示したものであるとして意図され、機能的に同等であるあらゆる構築物が本発明の範囲内に入ることから、本発明は、寄託された構築物によりその範囲が制限されるべきものではない。本書中の材料の寄託は、本書に含まれた明細書が本発明の最良の様式を含むそのあらゆる態様の実施を可能とするのに不適切であることの容認を構成するものではなく、また請求の範囲をそれが表わす特定の例示に制限するものとしてみなされるべきものでもない。実際、当業者には、本書に示され記述されているものに加えた発明のさまざまな修正が、以上の記述から明らかになると思われる、それらは添付の請求の範囲内に入るものである。

【配列表】

# Sequence Listing

```

<110> Genentech, Inc.

5

<120> Agonist Antibodies

10 <130> P0979R1

<150> US 60/056,736
<151> 1997-08-22

15 <160> 71

<210> 1
<211> 15
<212> DNA
20 <213> human

<400> 1
    acc tct tgg atc ggc 15
    Thr Ser Trp Ile Gly
25      1              5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
30 <213> human

<400> 2
    Thr Ser Trp Ile Gly
      1              5

35 <210> 3
<211> 66
<212> DNA
<213> human

40 <400> 3
    atc atg tat cct ggg aac tct gat acc aga cac aac 36
    Ile Met Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg His Asn
      1              5              10

45    ccg tcc ttc gaa gac cag gtc acc atg tca 66
    Pro Ser Phe Glu Asp Gln Val Thr Met Ser
      15              20      22

50 <210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> human

55 <400> 4
    ile Met Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg His Asn Pro Ser Phe
      1              5              10              15

    Glu Asp Gln Val Thr Met Ser
20      22

60 <210> 5

Sequence Listing

```

- 1 -

```

<211> 30
<212> DNA
<213> human

5  <400> 5
    gct ggg gtc gcg ggc ggt gct ttt gat ctc 30
    Ala Gly Val Ala Gly Gly Ala Phe Asp Leu
        1             5             10

10 <210> 6
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> human

15 <400> 6
    Ala Gly Val Ala Gly Gly Ala Phe Asp Leu
        1             5             10

20 <210> 7
    <211> 42
    <212> DNA
    <213> human

    <400> 7
25    act gga acc agc agt ggc gtt ggt ggt tat aac tat 36
    Thr Gly Thr Ser Ser Gly Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
        1             5             10

    gtc tcc 42
30    Val Ser
        14

    <210> 8
    <211> 14
    <212> PRT
    <213> human

    <400> 8
40    Thr Gly Thr Ser Ser Gly Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
        1             5             10             14

    <210> 9
    <211> 21
    <212> DNA
    <213> human

45 <400> 9
    ggt aac agc aat cgg ccc tca 21
    Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
        1             5             7

    <210> 10
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> human

55 <400> 10
    Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
        1             5             7

60 <210> 11
    <211> 30

```

Sequence Listing

- 2 -

```

<212> DNA
<213> human

<400> 11
5   agc aca tat gca ccc ccc ggt att att atg 30
    Ser Thr Tyr Ala Pro Pro Gly Ile Ile Met
      1             5             10

<210> 12
10  <211> 10
    <212> PRT
    <213> human

<400> 12
15  Ser Thr Tyr Ala Pro Pro Gly Ile Ile Met
    1             5             10

<210> 13
20  <211> 15
    <212> DNA
    <213> human

<400> 13
25  gac tac tac atg agc 15
    Asp Tyr Tyr Met Ser
      1             5

<210> 14
30  <211> 5
    <212> PRT
    <213> human

<400> 14
35  Asp Tyr Tyr Met Ser
    1             5

<210> 15
40  <211> 66
    <212> DNA
    <213> human

<400> 15
45  tac att agt agt agt ggt agt acc ata tac tac gca 36
    Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
      1             5             10

    gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc 66
    Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      15             20             22

50  <210> 16
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> human

55  <400> 16
    Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      1             5             10             15

60  Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      20             22

```

Sequence Listing

- 3 -

```

5    <210> 17
      <211> 27
      <212> DNA
      <213> human
      <400> 17
        tgg agt ggt gag gat gct ttt gat atc 27
        Trp Ser Gly Glu Asp Ala Phe Asp Ile
          1             5             9

10   <210> 18
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> human

15   <400> 18
        Trp Ser Gly Glu Asp Ala Phe Asp Ile
          1             5             9

20   <210> 19
      <211> 33
      <212> DNA
      <213> human

25   <400> 19
        cgg gcc agt gag ggt att tat cac tgg ttg gcc 33
        Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala
          1             5             10 11

30   <210> 20
      <211> 11
      <212> PRT
      <213> human

35   <400> 20
        Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala
          1             5             10 11

40   <210> 21
      <211> 21
      <212> DNA
      <213> human

      <400> 21
45   aag gcc tct agt tta gcc agt 21
        Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser
          1             5             7

      <210> 22
50   <211> 7
      <212> PRT
      <213> human

      <400> 22
55   Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser
          1             5             7

      <210> 23
60   <211> 27
      <212> DNA
      <213> human

```

Sequence Listing

- 4 -

```

5    <400> 23
      caa caa tat agt aat tat ccg ctc act 27
      Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
          1             5             9

10   <210> 24
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> human

15   <400> 24
      Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
          1             5             9

20   <210> 25
      <211> 15
      <212> DNA
      <213> human

25   <400> 25
      acc tac ggc atg cac 15
      Thr Tyr Gly Met His
          1             5

30   <210> 26
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> human

35   <400> 26
      Thr Tyr Gly Met His
          1             5

40   <210> 27
      <211> 66
      <212> DNA
      <213> human

45   <400> 27
      ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat gca 36
      Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala
          1             5             10

45   gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc 66
      Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
          15             20             22

50   <210> 28
      <211> 22
      <212> PRT
      <213> human

55   <400> 28
      Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          1             5             10             15

      Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
          20             22

60   <210> 29
      <211> 27
      <212> DNA
      Sequence Listing

```

- 5 -



```

<213> human

<400> 29
    gat agg ggg tcc tac ggt atg gac gtc 27
5      Asp Arg Gly Ser Tyr Gly Met Asp Val
        1             5             9

<210> 30
<211> 9
10 <212> PRT
    <213> human

<400> 30
    Asp Arg Gly Ser Tyr Gly Met Asp Val
15      1             5             9

<210> 31
<211> 66
<212> DNA
20 <213> human

<400> 31
    ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat gca 36
25      Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala
        1             5             10

    gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc 66
    Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser
        15             20             22

30 <210> 32
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> human
35 <400> 32
    Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
        1             5             10             15

40    Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser
        20             22

<210> 33
<211> 24
45 <212> DNA
    <213> human

<400> 33
    gga gca cat tat ggt ttc gat atc 24
50      Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile
        1             5             8

<210> 34
<211> 8
55 <212> PRT
    <213> human

<400> 34
    Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile
60      1             5             8

<210> 35
Sequence Listing

```

- 6 -

```

    <211> 33
    <212> DNA
    <213> human

5  <400> 35
    cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc 33
    Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala
      1              5              10 11

10 <210> 36
    <211> 15
    <212> DNA
    <213> human

15 <400> 36
    agc cat aac atg aac 15
    Ser His Asn Met Asn
      1              5

20 <210> 37
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> human

25 <400> 37
    Ser His Asn Met Asn
      1              5

30 <210> 38
    <211> 66
    <212> DNA
    <213> human

    <400> 38
35 tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca 36
    Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
      1              5              10

    gac tca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc 66
40 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      15              20      22

    <210> 39
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> human

    <400> 39
50 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      1              5              10      15

    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      20      22

55 <210> 40
    <211> 27
    <212> DNA
    <213> human

60 <400> 40
    gat cgc ggg agt acc ggt atg gac gtc 27
    Asp Arg Gly Ser Thr Gly Met Asp Val

```

Sequence Listing

- 7 -

```

1           5           9

<210> 41
<211> 9
5 <212> PRT
  <213> human

<400> 41
  Asp Arg Gly Ser Thr Gly Met Asp Val
10      1           5           9

<210> 42
<211> 15
<212> DNA
15 <213> human

<400> 42
  agt tac tac tgg agc 15
  Ser Tyr Tyr Trp Ser
20      1           5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
25 <213> human

<400> 43
  Ser Tyr Tyr Trp Ser
30      1           5

<210> 44
<211> 63
<212> DNA
35 <213> human

<400> 44
  tat atc tat tac agt ggg agc acc aac tac aac ccc 36
  Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
40      1           5           10

  tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca 63
  Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
45      15           20 21

<210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> human

50 <400> 45
  Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      1           5           10           15

  Ser Arg Val Thr Ile Ser
55      20 21

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
60 <213> human

<400> 46

```

Sequence Listing

- 8 -

```

          ggg agg tat ttt gac gtc 18
          Gly Arg Tyr Phe Asp Val
            1             5 6

5  <210> 47
   <211> 6
   <212> PRT
   <213> human

10 <400> 47
    Gly Arg Tyr Phe Asp Val
       1             5 6

   <210> 48
   <211> 42
   <212> DNA
   <213> human

15 <400> 48
    act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat 36
    Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
       1             5             10

   <210> 42
   <211> 14
   <212> PRT
   <213> human

20 <400> 49
    Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
       1             5             10             14

   <210> 50
   <211> 21
   <212> DNA
   <213> human

25 <400> 50
    gag ggc agt aag cgg ccc tca 21
    Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser
       1             5             7

   <210> 51
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> human

30 <400> 51
    Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser
       1             5             7

   <210> 52
   <211> 30
   <212> DNA
   <213> human

35 <400> 52
    agc tca tat aca acc agg agc act cga gtt 30

```

Sequence Listing

- 9 -

```

          Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val
          1             5             10

5  <210> 53
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> human

   <400> 53
10  Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val
    1             5             10

   <210> 54
   <211> 23
15  <212> DNA
   <213> artificial sequence

   <220>
   <221> Sequence is completely synthesized
20  <222> 1-23

   <400> 54
    agcggataac aatttcacac agg 23

25  <210> 55
   <211> 21
   <212> DNA
   <213> artificial sequence

30  <220>
   <221> Sequence is completely synthesized
   <222> 1-21

   <400> 55
35  gtcgtctttc cagacggtag t 21

   <210> 56
   <211> 44
   <212> PRT
40  <213> artificial sequence

   <220>
   <221> Sequence is completely synthesized
   <222> 1-44
45  <400> 56
    Cys Pro Pro Cys Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Arg Met Lys Gln
      1             5             10             15

50  Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu
      20             25             30

    Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg
      35             40             44

55  <210> 57
   <211> 43
   <212> DNA
   <213> artificial sequence

60  <220>
   <221> Sequence is completely synthesized
Sequence Listing - 10 -

```

```

<222> 1-43

<400> 57
5  gcttctgcgg ccacacaggc ctacgtgac atcgtgatga ccc 43

<210> 58
<211> 40
<212> DNA
10 <213> artificial sequence

<220>
<221> Sequence is completely synthesized
<222> 1-40

15 <400> 58
    atgatgatgt gccacggtcc gtttgatctc cagttcggtc 40

<210> 59
<211> 43
20 <212> DNA
    <213> artificial sequence

<220>
<221> Sequence is completely synthesized
25 <222> 1-43

<400> 59
    gcttctgcgg ccacacaggc ctacgcttcc tatgtgctga ctc 43

30 <210> 60
    <211> 40
    <212> DNA
    <213> artificial sequence

35 <220>
<221> Sequence is completely synthesized
<222> 1-40

<400> 60
40  ccttctctct ttaggttggc caaggcgggt cagcttggtc 40

<210> 61
<211> 43
<212> DNA
45 <213> artificial sequence

<220>
<221> Sequence is completely synthesized
<222> 1-43

50 <400> 61
    gcttctgcgg ccacacaggc ctacgtcag tctgtgctga ctc 43

<210> 62
<211> 39
55 <212> DNA
    <213> artificial sequence

<220>
60 <221> Sequence is completely synthesized
<222> 1-39

```

Sequence Listing

- 11 -

<400> 62  
 cattctacaa acgcgtacgc tcaggtgcag ctggtgcag 39

5 <210> 63  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

10 <220>  
 <221> Sequence is completely synthesized  
 <222> 1-45

<400> 63  
 gtaaattgtat gggcccttgg tggaggaggc actcgagacg gtgac 45

15 <210> 64  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

20 <220>  
 <221> Sequence is completely synthesized  
 <222> 1-39

25 <400> 64  
 cattctacaa acgcgtacgc tcaggtgcag ctggtggag 39

30 <210> 65  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

35 <220>  
 <221> Sequence is completely synthesized  
 <222> 1-39

<400> 65  
 cattctacaa acgcgtacgc tgacgtgcag ctggtgcag 39

40 <210> 66  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

45 <220>  
 <221> Sequence is completely synthesized  
 <222> 1-42

<400> 66  
 gtaaattgtat gggcccttgg tggcggctga ggagacggtg ac 42

50 <210> 67  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

55 <220>  
 <221> Sequence is completely synthesized  
 <222> 1-39

60 <400> 67  
 cattctacaa acgcgtacgc tcaggtgcag ctgcagcag 39

Sequence Listing - 12 -

```

5    <210> 68
      <211> 39
      <212> DNA
      <213> artificial sequence

      <220>
      <221> Sequence is completely synthesized
      <222> 1-39
10
      <400> 68
          cattctacaa acgcgtacgc tcaggtgcag ctgcaggag 39

      <210> 69
15    <211> 42
      <212> DNA
      <213> artificial sequence

      <220>
20    <221> Sequence is completely synthesized
      <222> 1-42

      <400> 69
          gtaaatgtat gggcccttgg tggaggctga agagacggta ac 42
25

      <210> 70
      <211> 12
      <212> PRT
      <213> artificial sequence
30

      <220>
      <221> Sequence is completely synthesized
      <222> 1-12

35    <400> 70
          Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu
              1             5             10             12

      <210> 71
40    <211> 66
      <212> PRT
      <213> artificial sequence

      <220>
45    <221> Sequence is completely synthesized
      <222> 1-66

      <400> 71
          Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val
          1             5             10             15
          Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala
              20             25             30
55    Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys
              35             40             45
          Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Ala Ala His
              50             55             60
60    Tyr Ala Leu Leu Pro Gly
              65             66

```

Sequence Listing

- 13 -

【図面の簡単な説明】

【図 1】

CDR及び枠組み領域のための配列を有する、10F6、5E5、10D10、12B5、12D5及び12E10と命名された、一本鎖抗体（scFv）フラグメントの例を示す図である。

【図 2】



ファージのコートタンパク質に融合した一本鎖抗体を含む、ファージライブラリーの構築の方法を示す図である。

【図3】

繊維状ファージの第3コートタンパク質上の融合タンパク質として表示した、一本鎖抗体を示す図である。

【図4】

一つ以上の結合選択周期によって、ファージライブラリー中の s c F v を選択する方法を示す図である。

【図5】

ビオチニル化抗原、及びストレプトアビジンコート常磁性ビーズを用いて、高親和性ファージを選別する方法を示す図である。

【図6】

ファージELISA法を用いて、c-m p l 結合性ファージを特定する方法を示す図である。

【図7】

B s t N I 制限酵素分析によって多様性を決定するための、クローンのDNAフィンガープリント法を示す図である。

【図8】

3%アガロースゲル上での典型的なB s t N I 分析を示す図である。実施例2を参照されたい。

【図9】

K I R A - E L I S A アッセイでのT P O に対するアゴニスト抗体の結果を示すグラフである。

【図10】

H U - 0 3 細胞についてのT P O - 抗体拮抗的結合アッセイの結果を示すグラフである。実施例1を参照されたい。

【図11】

実施例5のM u S K アゴニスト抗体についての活性を示す図である。

【図1】

	VH	F1	CDR1	F2
10F6	1	MAQVQLQESGGEMAKPGESLKISCKGYGYSPATSWIQWVRQMPGRGLEWM		
5E5	1	MAEVQLVQSGGGLVVRPGGSLRLSCAASGFTFSDYIMSWIRQAPGKGLEWV		
10D10	1	MAEVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAVSGITLRTYGMWVRQAPGKGLEWV		
12B5	1	MAQVQLVQSGGGLVVRPGGSLRLSCAVSGITLRTYGMWVRQAPGKGLEWV		
12D5	1	MAQVQLVESGGGLVVRPGGSLRLSCAASGFTFSHHNMWVRQAPGKGLEWV		
12E10	1	MAQVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSYYWVWIRQPPGKGLEWV		

	CDR2	F3
10F6	51	ATMYPGNSDTRHNPSFEDQVIMSDTISINTAYLQMSLKAASDTAMYYCAR
5E5	51	SVISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
10D10	51	AGISFDGRSEYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
12B5	51	AGISFDGRSEYYADSVQGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
12D5	51	SSISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
12E10	51	QYIYSGS-TMYPNPSLKSRVTISVDTSKSPSLKLSVTAADTAVYYCAR

	CDR3	F4	VL	F1
10F6	101	AGVAGGAFDLWGKGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQ-PASVSGS		
5E5	101	WGEDAFDIDWQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSAS		
10D10	101	DRGSTGMDVWGRGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSAS		
12B5	101	G-AHYGFDIDWQGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSAS		
12D5	101	DRGSTGMDVWGRGTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSAS		
12E10	100	----GRYPDVWGRGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGGSSVLTQ-PPSVSGS		

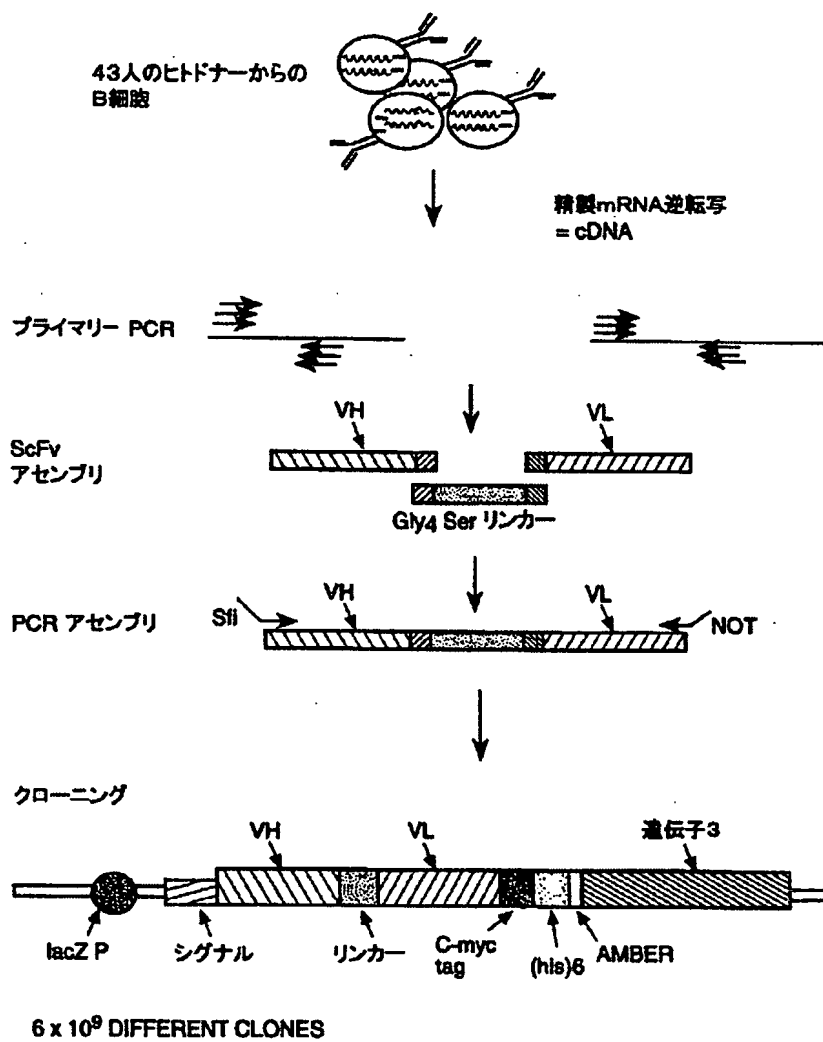
  

	CDR1	F2	CDR2
10F6	150	PGQSITISCTGTSSGVGGYNYVSWYQHPGKAPKLLIYGNMRFSGVPR	
5E5	150	VGDRVAITCRASE---GIYHWLAWYQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSR	
10D10	150	IGDRVTTICRASE---GIYHWLAWYQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSR	
12B5	149	IGDRVTTICRASE---GIYHWLAWYQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSR	
12D5	150	IGDRVTTICRASE---GIYHWLAWYQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSR	
12E10	145	PGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLLIYEGSKRPSGVSNR	

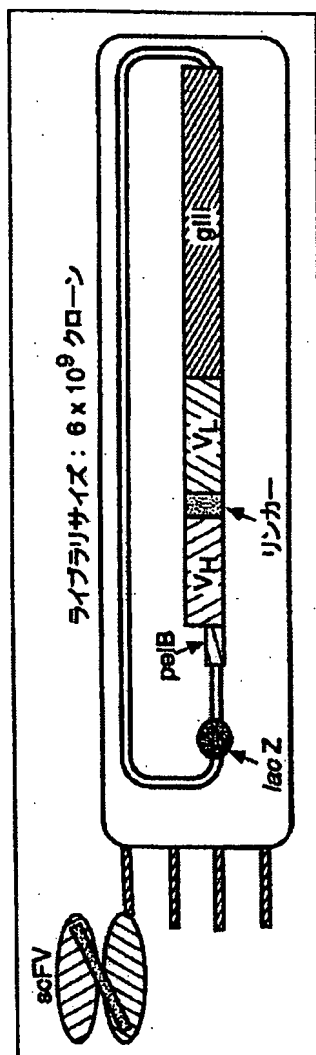
  

	F3	CDR3	F4
10F6	200	FSASKSGNTASLTISGLQAEADYPCSTYAPPGIIMFGOOTKLTVLGAA	
5E5	197	FSGSGSGADFTLTISLQPDFFATYYQQYSNYPL-TPGGGKLEIKRAA	
10D10	197	FSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYQQYSNYPL-TPGGGKLEIKRAA	
12B5	196	FSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYQQYSNYPL-TPGGGKLEIKRAA	
12D5	197	FSGSGSGTDFTKTISLQPDFFATYYQQYSNYPL-TPGGGKLEIKRAA	
12E10	195	FSGSKSGNTASLTISGLQAEADYPCSYTTRSTRVFGGGKLTVLGAA	

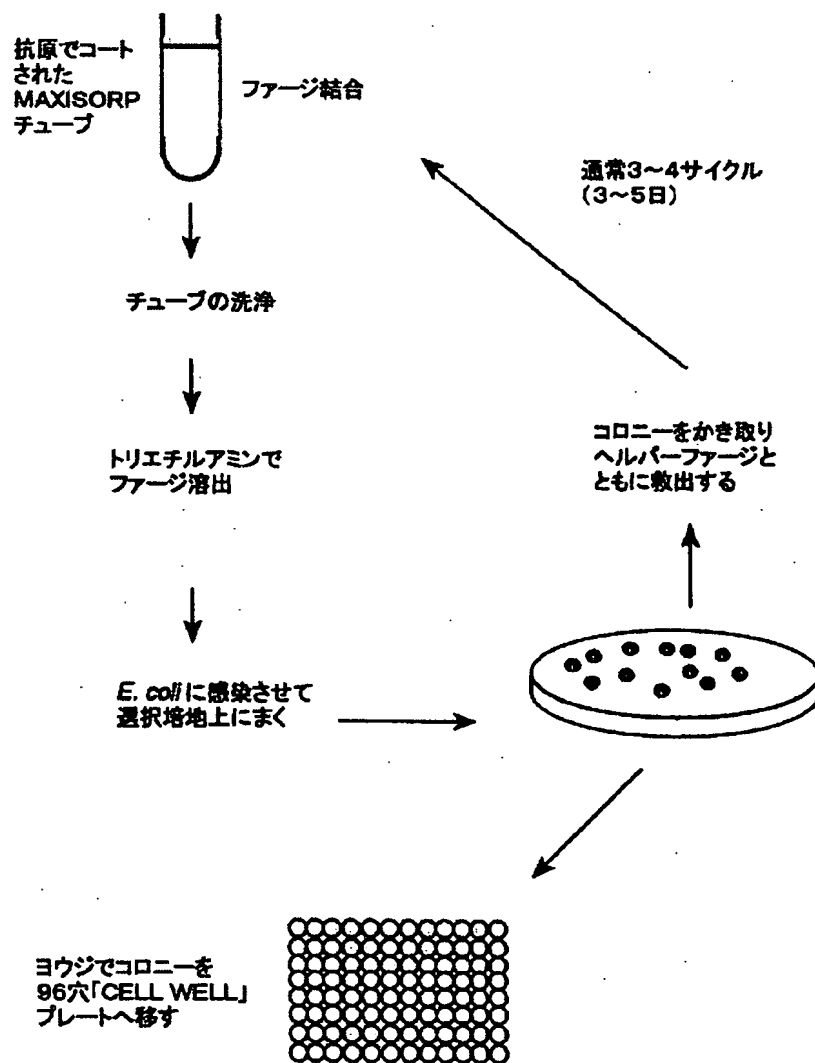
【図2】



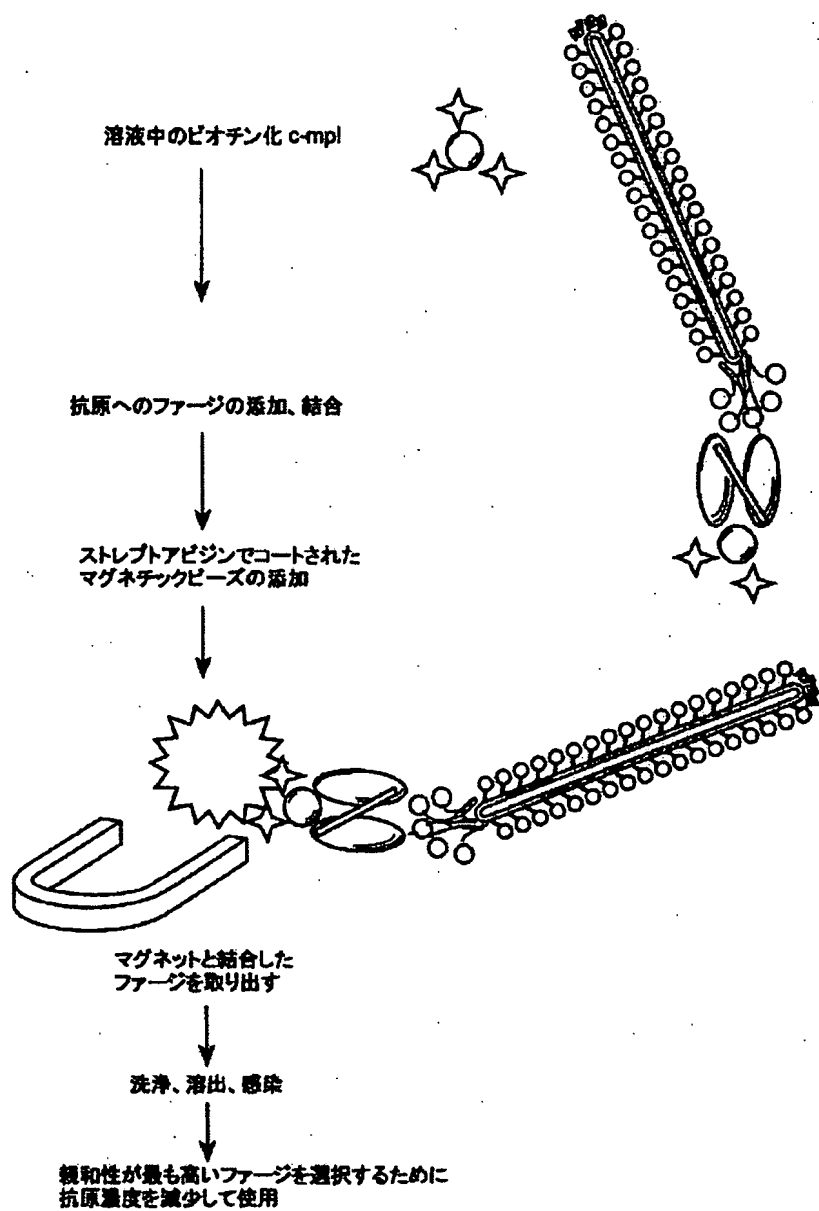
【図3】



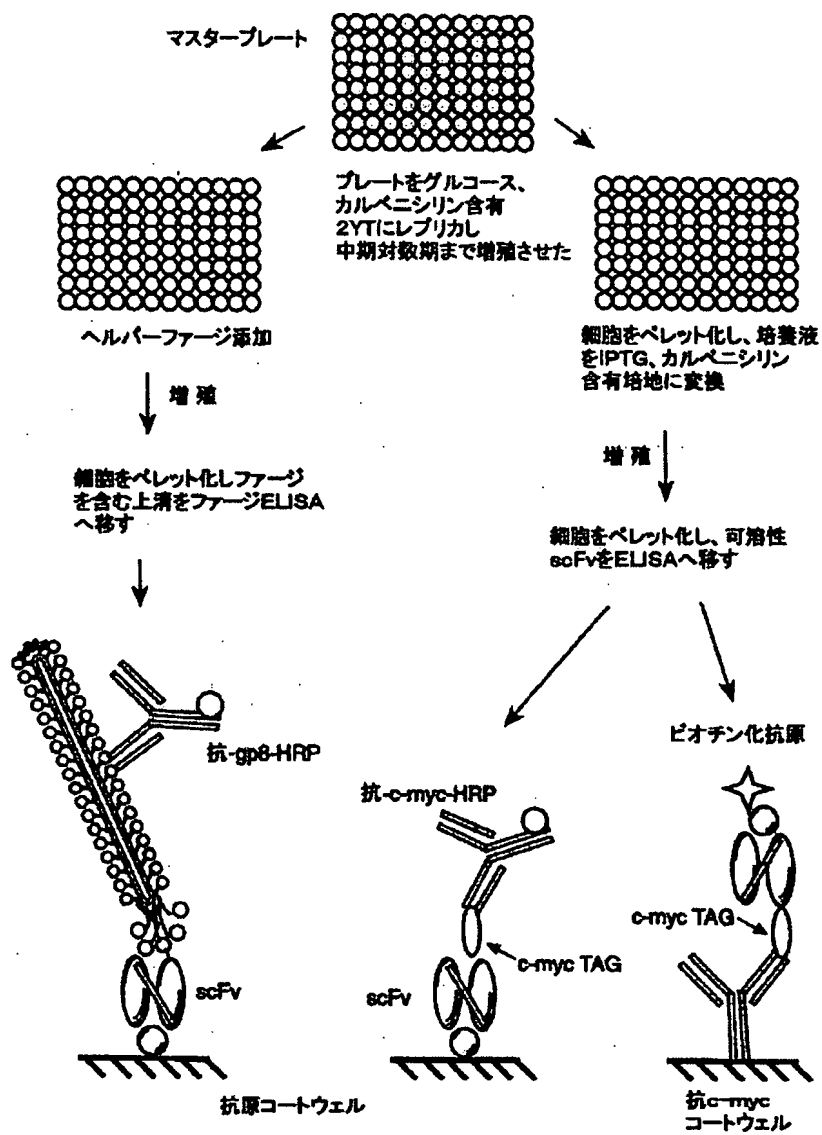
【図4】



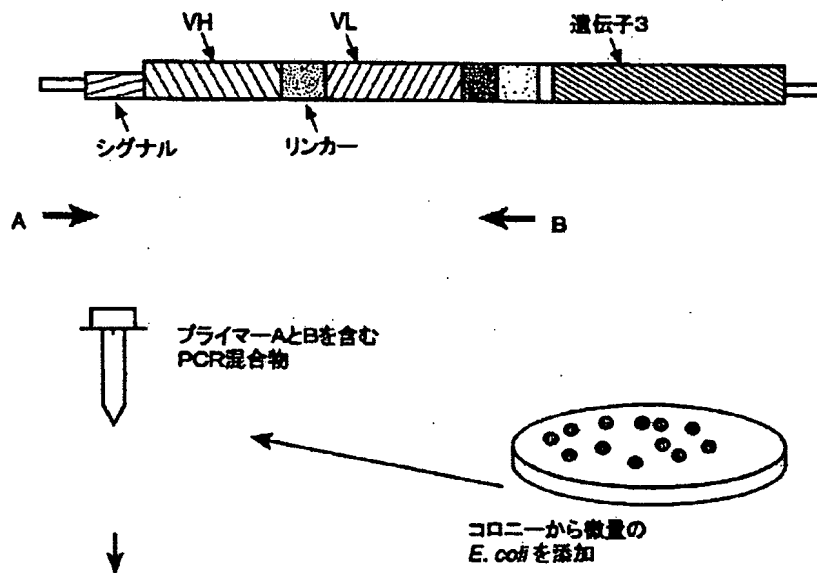
【図5】



【図 6】



【図7】

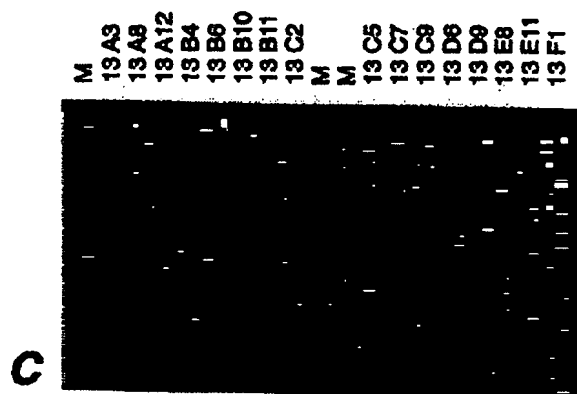
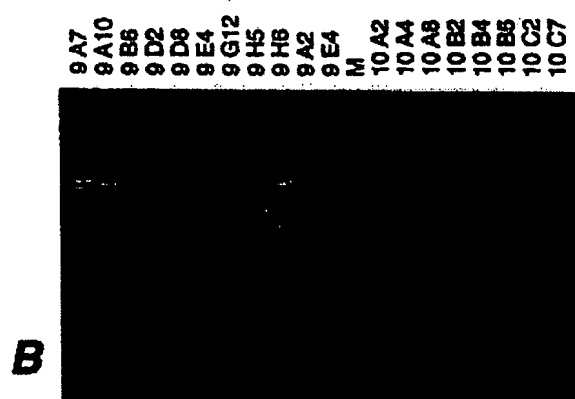
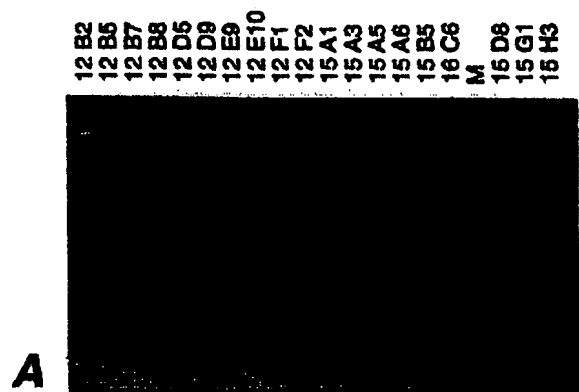


アガロースゲルに1kbバンドが認められた

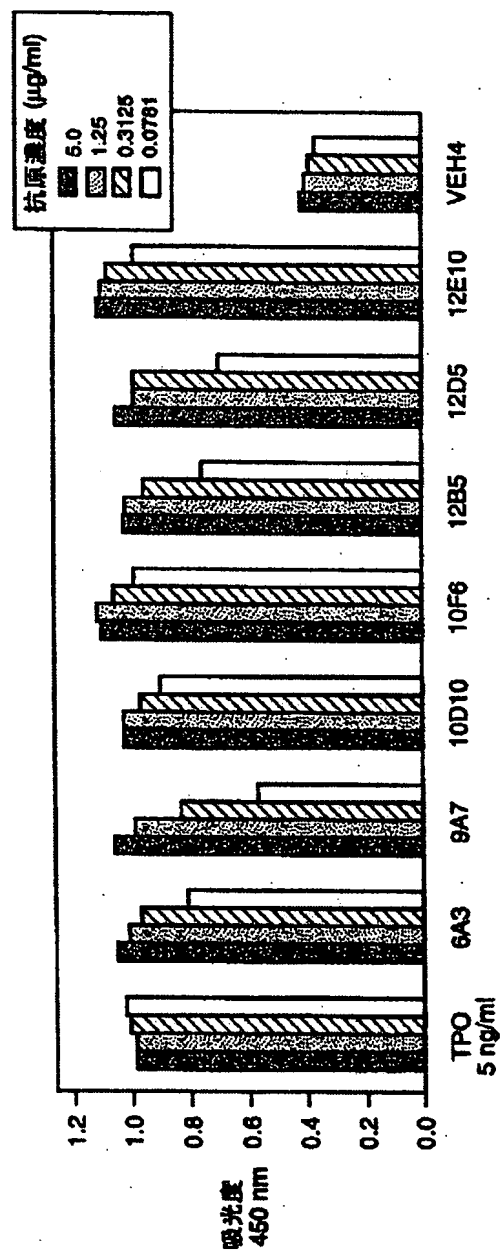
制限酵素BstNIで消化

3%アガロースゲル上での産物分析

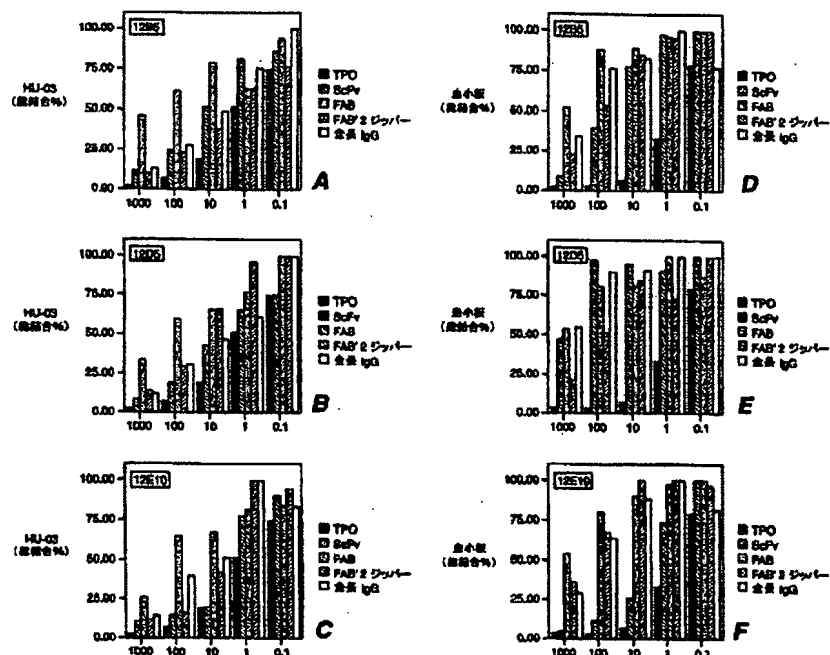




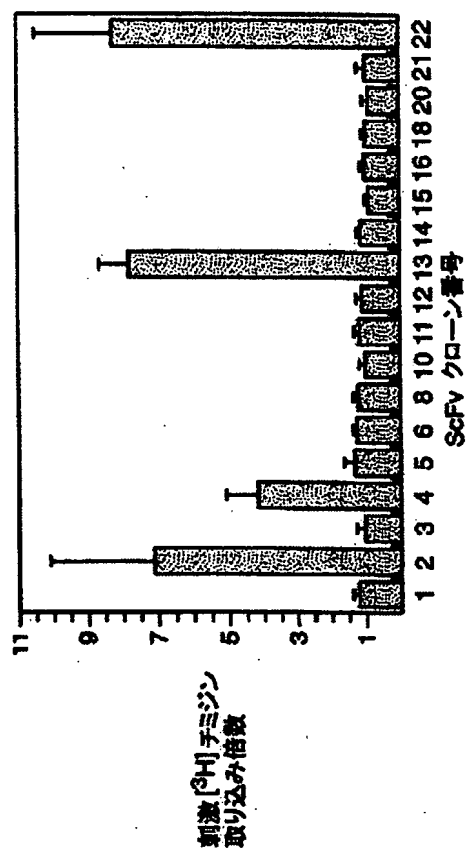
【図 9】



【図10】



【図11】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. national Application No.

PCT/US 98/17364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12N15/13 C07K16/28 C07K17/00 A61K39/395 C07K19/00  
 C12N15/85 C12N5/10 //C12N15/62,C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. DENG ET AL.: "An agonist murine monoclonal antibody to the human c-mpl receptor stimulates in vitro megakaryocytopoiesis." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 24, no. 9, August 1996, page 260 XP002095741 Charlottesville, USA see abstract 1072	1-3,5,6, 8,13,15, 17,29-32
X	WO 95 27061 A (GENENTECH) 12 October 1995 see page 13, line 3 - page 15, line 7 see claims	38,39,42
X	WO 95 27062 A (GENENTECH) 12 October 1995 see page 8, line 8 - page 11, line 14 see claims	38,39,42
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 1999

Date of mailing of the international search report

18/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentleer 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/US 98/17364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M-H. XIE ET AL.: "Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist scFv." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, August 1997, pages 768-771, XP002095742 New York, USA see the whole document ---	37-39, 41,42
A	WO 95 14930 A (GENENTECH) 1 June 1995 see example 4 see figures 17,18A see claims ---	38,39,42
P,X	C. ADAMS ET AL.: "Development of potent agonist antibodies to c-mpl from a human scFv phage display library." BLOOD, vol. 90, no. 10 suppl. 1, part 1 of 2, 15 November 1997, page 55a XP002095743 New York, USA see abstract 236 ---	1-3,5-8, 14,15, 20,21, 24,29, 38-40
P,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 003, 27 February 1998 & JP 09 289892 A (YAMANOUCHI PHARMACEUT CO LTD), 11 November 1997 see abstract -----	1-6,8, 13,15, 17-19, 29-32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/17364

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 29, 31, 38-40 and 42 (all partially, as far as an in vivo method is concerned) and claims 30, 32 and 41 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Although claims 29, 31, 38-40 and 42 (all partially, as far as an in vivo method is concerned) and claims 30, 32 and 41 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 98/17364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9527061 A	12-10-1995	US 5635177 A	03-06-1997
		CA 2185656 A	12-10-1995
		EP 0804572 A	05-11-1997
		JP 9511644 T	25-11-1997
WO 9527062 A	12-10-1995	US 5635388 A	03-06-1997
		CA 2185211 A	12-10-1995
		EP 0754230 A	22-01-1997
		JP 9512163 T	09-12-1997
WO 9514930 A	01-06-1995	AT 163231 T	15-02-1998
		AU 697142 B	01-10-1998
		AU 1180095 A	13-06-1995
		AU 698975 B	12-11-1998
		AU 1210895 A	13-06-1995
		CA 2175892 A	01-06-1995
		CA 2175893 A	01-06-1995
		DE 69408541 D	19-03-1998
		DE 69408541 T	06-08-1998
		EP 0730646 A	11-09-1996
		EP 0730740 A	11-09-1996
		ES 2116066 T	01-07-1998
		GR 3026430 T	30-06-1998
		JP 9506250 T	24-06-1997
		JP 9505889 T	10-06-1997
		WO 9514776 A	01-06-1995
		US 5766863 A	16-06-1998
		US 5709858 A	20-01-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	7/06	A 6 1 P	37/02
	37/02	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/28		17/00
	17/00		19/00
	19/00	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P	21/08		5/00
			Z N A A
			B
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U Z, V N, Y U, Z W		
(72)発明者	フェンドリー, ブライアン・エム アメリカ合衆国、カリフォルニア 94109, ハーフ・ムーン・ベイ、トルーン・ウェイ 125		
(72)発明者	ガーニー, オースティン・エル アメリカ合衆国、カリフォルニア 94002, ベルモント、デビー・レーン 1		